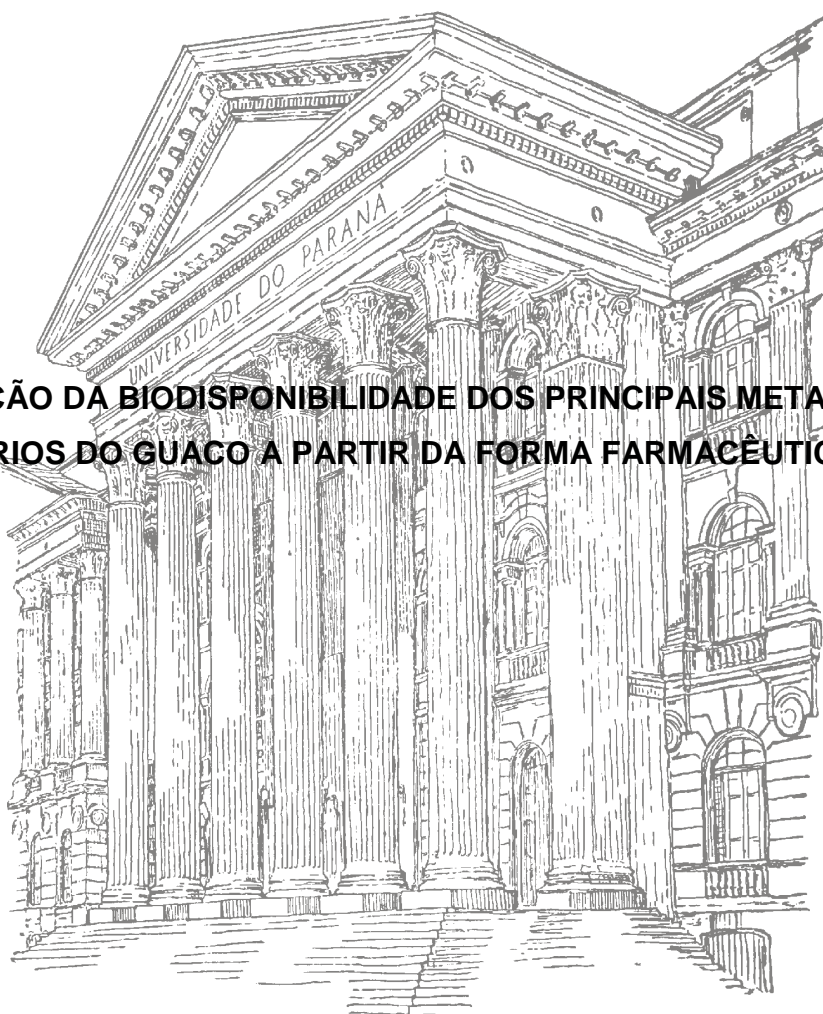


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**JOÃO CLEVERSON GASPARETTO**

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS DO GUACO A PARTIR DA FORMA FARMACÊUTICA XAROPE**



**CURITIBA**

**2013**

---

**JOÃO CLEVERSON GASPARETTO**

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS DO GUACO A PARTIR DA FORMA FARMACÊUTICA XAROPE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

**CURITIBA**

**2013**

---

---

# TERMO DE APROVAÇÃO


**JOÃO CLEVERSON GASPARETTO**

**Título: AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DOS PRINCIPAIS METABOLITOS SECUNDÁRIOS DO GUACO A PARTIR DA FORMA FARMACÊUTICA XAROPE**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

  
Prof. Dr. Roberto Pontarolo  
Orientador

  
Prof. Dr. Eloiir Paulo Schenkel  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
Prof. Dr. Gerson Antonio Pianetti  
Universidade Federal de Minas Gerais

  
Prof. Dr. José Domingos Fontana  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

  
Prof. Dr. Elza Kimura  
Universidade Estadual de Maringá

Curitiba, 14 de maio de 2013.

---

---

À Rene Iolando Sanzovo e Oliva Justina Affornalli Sanzovo,  
*Se a palavra amor pudesse mensurar a gratidão que tenho por vocês, eu diria que  
amo vocês mais do que tudo.*

---

---

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo, o qual na última década foi pai, amigo, conselheiro e orientador. É por causa de pessoas como ele que consegui chegar onde cheguei, e por isso gostaria muito de honrá-lo com a minha mais sincera gratidão. Muito obrigado por todas as oportunidades! A vida lhe recompensará por tudo, acredite, você merece!*

*A todos da minha família meus sinceros agradecimentos pela educação, convívio, aprendizado e principalmente por me ensinarem alguns valores que hoje são raros na humanidade.*

*Aos meus avós maternos Rene Iolando Sanzovo e Oliva Justina Affornalli Sanzovo pelo exemplo de humildade, bondade, trabalho, educação e pelo amor que me foi dado. Nonninho e Nonninha, muito obrigado por tudo!*

*Aos meus grandes amigos de laboratório Flávia Lada Degaut, Caroline Paola Uber, Cleverson Antonio Ferreira Martins, Marco André Cardoso, Carlos Francisco Pedroso, Fernanda Smolarek, Letícia Leonart, Victor Concentino, Rômulo Pereira Ribeiro e Gisele Floriani, pela parceria, aprendizado e coletividade. Em especial gostaria de agradecer a Letícia Bonâncio Cerqueira e a Thais Martins Guimarães pelo carinho, amizade e grande dedicação ao meu projeto.*

*À Professora Rosângela G. Peccinini (UNESP) pela sua disponibilidade e contribuição na realização desse trabalho, e por acreditar que esse projeto traria bons frutos.*

*À agência de fomento à pesquisa CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante toda a Pós Graduação e à Universidade Federal do Paraná por ter possibilitado meu desenvolvimento intelectual.*

*Aos professores Obdúlio Gomes Miguel, José Domingues Fontana, Alan Guilherme Gonçalves, Cassyano Januario Correr e Ângela Badaró Trindade pelo respeito e amizade de longos anos. À professora Francinete Ramos Campos pela grande colaboração não só no projeto, mas também no meu desenvolvimento intelectual.*

*Aos voluntários que participaram do estudo e disponibilizaram seu tempo para que a ciência pudesse evoluir.*

*À Dra. Lúcia Marina Rodrigues por ter um dia acreditado que eu poderia ser melhor, por iniciar minha carreira e por me mostrar que tudo é possível.*

---

---

## RESUMO

O objetivo com este trabalho foi realizar um estudo farmacocinético da cumarina (CUM), 7-hidroxycumarina (7-HC), ácido o-cumárico (AOC) e ácido caurenóico (CAU) em voluntários sadios. Para quantificação em plasma dessas substâncias, dois métodos por CLAE-EM/EM foram desenvolvidos e validados. A pré-purificação dos analitos foi realizada por meio de extração líquido-líquido com *tert*-butil metil éter e através da técnica de precipitação de proteínas com acetonitrila. A cumarina, a 7-hidroxycumarina e o padrão interno (PI) 6-metilcumarina foram monitorados no modo positivo de ionização enquanto que os ácidos o-cumárico, caurenóico, isoferúlico (PI) e a prednisona (PI) no modo negativo de ionização. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna XBridge Shield RP18 150 x 2,1 mm (tamanho de partícula 5 µm). Para o modo positivo de ionização a fase móvel foi composta de uma mistura de acetonitrila/água/ácido fórmico (65:35:0.05, v/v/v) eluída em modo isocrático. Para o modo negativo de ionização a fase móvel foi composta de um gradiente entre água e acetonitrila/água (95:5, v/v), ambos contendo 1 mM de formiato de amônio. Os resultados de validação mostraram que os novos métodos são seletivos e livres de efeito residual e de matriz. Os baixos limites de detecção (1,5 ng/mL para CAU, 3,0 ng/mL para CUM e 2,5 ng/mL para 7-HC e AOC) e de quantificação (5,0 ng/mL para CAU, 7,5 ng/mL para 7-HC e 10,0 ng/mL para AOC e CUM) indicaram que os novos métodos são muito sensíveis. As curvas de calibração apresentaram uma excelente correlação ( $r \geq 0,99$ ) nas faixas de 10,0 - 1500 ng/mL para CUM, 7,5 - 1000 ng/mL para 7-HC, 10,0 - 1000 ng/mL para AOC e 5,0 - 750 ng/mL para AOC. Nos diferentes níveis de concentração as variações de precisão e exatidão foram  $< 10,2\%$ . A recuperação dos analitos e PI ( $> 70\%$ ) foi obtida com elevada precisão ( $CV < 5,0\%$ ). Sob as condições normais de trabalho, uma excelente estabilidade dos analitos foi observada tanto em plasma quanto em solução. Os métodos foram aplicados na análise da CUM, 7-HC, AOC e CAU no plasma de voluntários que receberam via oral o xarope de guaco, ou xarope de guaco fortificado com CUM. O estudo conduzido com 60 mL de xarope de guaco, em dose única, mostrou que a quantidade destas substâncias presentes no xarope não proporciona níveis plasmáticos suficientes para serem detectados pelos métodos bioanalíticos validados. A administração de 60 mL de xarope fortificado com 1500 mg de cumarina resultou em níveis plasmáticos de CUM, 7-HC e AOC suficientes para a determinação de seus parâmetros farmacocinéticos. Neste estudo foi possível verificar que a eliminação de AOC é dependente da sua taxa de formação e que AOC é um dos principais metabolitos biodisponíveis da CUM. Esses resultados reforçam a necessidade da condução de novos estudos para avaliar o potencial tóxico e terapêutico do AOC. O estudo também demonstrou que os níveis plasmáticos de 7-HC são extremamente baixos e o seu perfil farmacocinético sugere significativo metabolismo sequencial hepático com baixo acesso à circulação sistêmica. Esse estudo ainda reuniu evidências de que a administração do xarope de guaco na dose recomendada não proporciona níveis plasmáticos suficientes de CUM, 7-HC e AOC para o efeito broncodilatador esperado. Esse resultado sugere que estudos clínicos devem ser realizados para validar a eficácia deste fitoterápico. Só assim será possível garantir os benefícios do guaco, ou quem sabe impedir que recursos públicos sejam alocados para compra de medicamentos que não trazem nenhum benefício à população.

**Palavras chave:** Guaco, biodisponibilidade, farmacocinética, cumarina, 7-hidroxycumarina, ácido o-cumárico, ácido caurenóico.

---

---

## ABSTRACT

The objective of this work was to perform a kinetic study of coumarin (COU), 7-hydroxycoumarin (7-HC), o-coumaric acid (OCA) and kaurenoic acid (KAU) in plasma of volunteers who orally received guaco syrup. For study conduction two HPLC-ESI-MS/MS methods were developed and validated. The analytes were extracted by liquid-liquid extraction using *tert*-butyl methyl ether and by protein precipitation using acetonitrile. COU, 7-HC and the internal standard (IS) 6-methylcoumarin were monitored in positive ion mode method, whereas OCA, KAU, isoferulic acid (IS) and prednisone (IS) in negative ion mode method. Chromatographic separation was achieved using an XBridge Shield RP18 150 x 2.1-mm (5  $\mu$ m particle size) column. For the positive ion mode, the isocratic mobile phase consisted of acetonitrile/water/formic acid (65:35:0.05, v/v/v). For the negative ion mode, the mobile phase consisted of a gradient of water and acetonitrile/water 95:5 v/v, both containing 1mM ammonium formate. Data from validation studies demonstrated that the new methods are highly selective and free of matrix and residual effects. The lower limits of detection (1.5 ng/mL for KAU, 3.0 ng/mL for COU and 2.5 ng/mL for 7-HC and OCA) and quantification (5.0 ng/mL for KAU, 7.5 ng/mL for 7-HC and 10.0 ng/mL for OCA and COU) indicated that the new methods are highly sensitive. All of the calibration curves showed excellent coefficients of correlation ( $r \geq 0.99$ ) over the ranges of 10.0 – 1500 ng/mL for COU, 7.5 – 1000 ng/mL for 7-HC, 10.0 – 1000 ng/mL for OCA and 5.0 – 750 ng/mL for KAU. At different levels the variations of accuracy and precision were  $< 10.2\%$ . The recovery of the analytes and the IS ( $> 70\%$ ) was reached with high precision (RSD  $< 5.0\%$ ). Under normal working conditions, an excellent stability of the analytes was observed in both plasma and solutions. The methods were successfully applied for determining COU, 7-HC, OCA and KAU in plasma volunteers who orally received guaco syrup or guaco syrup spiked with COU. In volunteers who received 60 mL guaco syrup (single dose) the bioavailability of COU, 7-HC, OCA and KAU was insufficient to reach quantifiable levels of these substances. By administering 60 mL of guaco syrup spiked with 1500 mg of COU, sufficient levels of COU, 7-HC and OCA were obtained and the pharmacokinetic parameters of each compound were determined. The study demonstrated that OCA is one of the main bioavailable metabolite of COU making necessary additional studies to evaluate their toxic and therapeutic potential in humans. Analysis of pharmacokinetic parameters demonstrated that the elimination of OCA is limited to its rate formation. The study also demonstrated that the plasmatic levels of 7-HC are extremely low. The kinetic profile of 7-HC suggests sequential metabolism in the liver with low access of 7-HC to the systemic circulation. The study also evidenced that the recommended dose of guaco syrup does not provide sufficient levels of the main guaco metabolites to obtain a bronchodilation effect. Because the use of guaco have public health impact, clinical studies are necessary to prove their efficacy or to avoid public spending.

**Keywords:** Guaco, bioavailability, pharmacokinetic, coumarin, 7-hydroxycoumarin, o-coumaric acid, kaurenoic acid

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADME	–	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
ANVISA	–	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AD <sub>50</sub>	–	Dose adequada média
AOC	–	Ácido <i>o</i> -cumárico
ASC	–	Área sob a curva
ASC <sub>0-t</sub>	–	Área sob a curva do tempo zero até o tempo da última coleta
ASC <sub>0-∞</sub>	–	Área sob a curva de concentração plasmática extrapolada ao infinito
CAU	–	Ácido caurenóico
CL	–	<i>Clearance</i>
CLAE	–	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	–	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas e recursos <i>Tandem</i>
C <sub>max</sub>	–	Concentração máxima da droga em plasma observada em um período particular
Cps	–	Contagens por segundo
CQ	–	Amostra de controle de qualidade
CQA	–	Amostra de controle de qualidade de alta concentração
CQB	–	Amostra de controle de qualidade de baixa concentração
CQD	–	Amostra de controle de qualidade de diluição
CQ-LIQ	–	Amostras de controle de qualidade do limite inferior de quantificação
CQM	–	Amostra de controle de qualidade de média concentração
CUM	–	Cumarina (1,2 benzopirona)
CV	–	Coeficiente de variação
DC	–	Débito cardíaco
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
EC <sub>50</sub>	–	Metade da concentração média eficaz calculada
EM	–	Espectrometria de massas
E <sub>max</sub>	–	Efeito máximo
ER	–	Erro relativo
ESI	–	Ionização por <i>electrospray</i>
ESI-	–	Ionização por <i>electrospray</i> operada no modo negativo de ionização
ESI+	–	Ionização por <i>electrospray</i> operada no modo positivo de ionização
FIA	–	Análise por injeção em fluxo

---



---

g	–	Grama
IC <sub>50</sub>	–	Concentração máxima inibitória média
ISOF	–	Ácido isoferúlico
K <sub>el</sub>	–	Constante de eliminação
Kg	–	Quilograma
L	–	Litro
LD	–	Limite de detecção
LIQ	–	Limite inferior de quantificação
<i>m/z</i>	–	Razão massa/carga
mg	–	Miligrama
min	–	Minuto
mL	–	Mililitro
mm	–	Milímetro
mM	–	Milimolar
μL	–	Microlitro
μm	–	Micrômetro
μM	–	Micromolar
MRM	–	Monitoramento de reações múltiplas
N	–	Normal
NCA	–	Análise não compartimental
ng	–	Nanograma
pH	–	Potencial hidrogeniônico
PI	–	Padrão (ões) interno(s)
PPT	–	Precipitação de proteínas
PRED	–	Prednisona
r	–	Coeficiente de correlação
SPE	–	Extração em fase sólida
T <sub>1/2</sub>	–	Meia vida de eliminação
TBME	–	<i>tert</i> -butil metil éter
T <sub>max</sub>	–	Tempo em que a concentração máxima da droga foi observada no plasma
V	–	Volts
v/v	–	volume/volume
v/v/v	–	volume/volume/volume
Vd	–	Volume de distribuição aparente
6-MC	–	6-metilcumarina
7-HC	–	7-hidroxycumarina

---

---

## LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 -	CÁLCULO DO VOLUME DE DISTRIBUIÇÃO.....	51
EQUAÇÃO 2 -	CÁLCULO DO <i>CLEARANCE</i> .....	52
EQUAÇÃO 3 -	CÁLCULO DA MEIA VIDA DE ELIMINAÇÃO DE UM FÁRMACO.....	53
EQUAÇÃO 4 -	CÁLCULO DO DESVIO PADRÃO RELATIVO UTILIZADO NO ENSAIO DE PRECISÃO.....	71
EQUAÇÃO 5 -	CÁLCULO DO ERRO PADRÃO RELATIVO UTILIZADO NO ENSAIO DE EXATIDÃO.....	71
EQUAÇÃO 6 -	CÁLCULO DA RECUPERAÇÃO.....	72
EQUAÇÃO 7 -	CÁLCULO DO FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO (FMN)..	73
EQUAÇÃO 8 -	<i>CLEARANCE</i> DA CUMARINA OBTIDO COM OS VOLUNTÁRIOS QUE RECEBERAM UMA DOSE DE 60 ML DO XAROPE DE GUACO FORTIFICADO COM 1500 MG DO ATIVO.....	117
EQUAÇÃO 9 -	CÁLCULO DO DÉBITO CARDÍACO.....	118
EQUAÇÃO 10 -	VOLUME DE DISTRIBUIÇÃO DA CUMARINA OBTIDO COM OS VOLUNTÁRIOS QUE RECEBERAM UMA DOSE DE 60 ML DO XAROPE DE GUACO FORTIFICADO COM 1500 MG DO ATIVO.....	119

---

---

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	<i>Mikania glomerata</i> Spreng.....	25
FIGURA 2 –	<i>Mikania laevigata</i> Sch. Bip. ex Baker.....	25
FIGURA 3 –	ROTAS DE METABOLISMO DA CUMARINA EM HUMANOS, RATOS E CAMUNDONGOS.....	32
FIGURA 4 –	EXEMPLO DE UMA CURVA TEMPORAL DE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE UM FÁRMACO ADMINISTRADO VIA ORAL EM DOSE ÚNICA, MOSTRANDO A CONCENTRAÇÃO SISTÊMICA MÁXIMA ( $C_{MÁX}$ ), O TEMPO DO PICO DE CONCENTRAÇÃO MÁXIMA ( $T_{MÁX}$ ), A ÁREA SOB A CURVA DO TEMPO ZERO ATÉ O TEMPO DA ÚLTIMA COLETA ( $ASC_{0-t}$ ) E A ÁREA SOB A CURVA DE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA EXTRAPOLADA AO INFINITO ( $ASC_{0-\infty}$ ).....	49
FIGURA 5 –	DISTRIBUIÇÃO DE UM FÁRMACO NOS MODELOS DE UM E DOIS COMPARTIMENTOS.....	56
FIGURA 6 –	ESTRUTURA QUÍMICA DA (A) CUMARINA, (B) 7-HIDROXICUMARINA, (C) 6-METILCUMARINA, (D) ÁCIDO O-CUMARICO, (E) ÁCIDO ISOFERULICO, (F) ÁCIDO CAURENÓICO E (G) PREDNISONA.....	59
FIGURA 7 –	CROMATOGRAMAS OBTIDOS COM AMOSTRAS DE PLASMA FORTIFICADAS COM CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E 6-METILCUMARINA (PI), UTILIZANDO DIFERENTES PROPORÇÕES DE ACETONITRILA E ÁGUA (AMBOS CONTENDO 0,05% DE ÁCIDO FÓRMICO) NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.....	86
FIGURA 8 –	CROMATOGRAMAS OBTIDOS COM AMOSTRAS DE PLASMA FORTIFICADAS COM CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E 6-METILCUMARINA, UTILIZANDO DIFERENTES FLUXOS DA FASE MÓVEL.....	87
FIGURA 9 –	CROMATOGRAMAS OBTIDOS COM AMOSTRAS DE PLASMA FORTIFICADAS COM CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E 6-METILCUMARINA, UTILIZANDO DIFERENTES TEMPERATURAS NA COLUNA.....	88
FIGURA 10 –	CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E 6-METILCUMARINA OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM COM O MÉTODO OTIMIZADO.....	88

---

---

FIGURA 11 –	CROMATOGRAMAS OBTIDOS COM AMOSTRAS DE PLASMA FORTIFICADAS COM ÁCIDO O-CUMÁRICO, ÁCIDO CAURENÓICO, ÁCIDO ISOFERÚLICO E PREDNISONA UTILIZANDO DIFERENTES TEMPERATURAS NA COLUNA.....	90
FIGURA 12 –	CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM OS ÁCIDOS O-CUMÁRICO, CAURENÓICO, ISOFERÚLICO (PI) E PREDNISONA (PI) OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM COM O MÉTODO OTIMIZADO.....	91
FIGURA 13 –	RECUPERAÇÃO DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA, 6-METILCUMARINA (IS), ÁCIDO O-CUMÁRICO, ÁCIDO CAURENÓICO, ÁCIDO ISOFERÚLICO (IS) E PREDNISONA (IS) OBTIDA EM PLASMA COM DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO.....	93
FIGURA 14 –	CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) PARA O ESTUDO DA SELETIVIDADE.....	95
FIGURA 15 –	CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI-) PARA O ESTUDO DE SELETIVIDADE.....	96
FIGURA 16 –	EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E GRÁFICO DE LINEARIDADE DA CUMARINA OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	98
FIGURA 17 –	EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E GRÁFICO DE LINEARIDADE DA 7-HIDROXICUMARINA OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	99
FIGURA 18 –	EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E GRÁFICO DE LINEARIDADE DO ÁCIDO O-CUMÁRICO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	100
FIGURA 19 –	EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E GRÁFICO DE LINEARIDADE DO ÁCIDO CAURENÓICO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	101
FIGURA 20 –	CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) ATRAVÉS DE INJEÇÕES ALTERNADAS DE (A) AMOSTRAS CONTROLE PREPARADAS NO NÍVEL MAIS ALTO DE CONCENTRAÇÃO E (B) AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO.	102
FIGURA 21 –	CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI-) ATRAVÉS DE INJEÇÕES ALTERNADAS DE (A) AMOSTRAS CONTROLE PREPARADAS NO NÍVEL MAIS ALTO DE CONCENTRAÇÃO E (B) AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO.	102

---

---

FIGURA 22 –	PERFIL TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DA (A) CUMARINA, (B) 7-HIDROXICUMARINA E (C) ÁCIDO O-CUMÁRICO OBTIDOS COM VOLUNTÁRIOS HUMANOS QUE RECEBERAM 60 ML DE XAROPE DE GUACO FORTIFICADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CUMARINA.....	110
FIGURA 23 –	METABOLISMO DA CUMARINA EM HUMANOS VIA 7-HIDROXILAÇÃO E POSSÍVEIS ROTAS DE METABOLISMO DA CUMARINA VIA HIDRÓLISE DO ANEL LACTONA.....	112
FIGURA 24 –	PERFIL TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA MÉDIA DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E ÁCIDO O-CUMÁRICO.....	114
FIGURA 25 –	ESQUEMA REPRESENTANDO A CIRCULAÇÃO ENTERO-HEPÁTICA DA CUMARINA E SEUS METABÓLITOS.....	115

---

---

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	VOLUME FISIOLÓGICO DOS PRINCIPAIS COMPARTIMENTOS DO ORGANISMO HUMANO, E OS VOLUMES DE DISTRIBUIÇÃO CORRESPONDENTES À DISTRIBUIÇÃO DO FÁRMACO EM CADA UM DESSES COMPARTIMENTOS.....	51
TABELA 2 –	ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA A DETERMINAÇÃO EM PLASMA DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E 6-METILCUMARINA....	62
TABELA 3 –	ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA A DETERMINAÇÃO EM PLASMA DO ÁCIDO O-CUMÁRICO, ÁCIDO CAURENÓICO, ÁCIDO ISOFERÚLICO E PREDNISONA.....	63
TABELA 4 –	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO E ÁCIDO CAURENÓICO.....	68
TABELA 5 –	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE .....	70
TABELA 6 –	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO E ÁCIDO CAURENÓICO UTILIZADOS PARA AVALIAR O EFEITO MATRIZ.....	73
TABELA 7 –	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO E ÁCIDO CAURENÓICO UTILIZADOS NO ENSAIO DE ESTABILIDADE DE PÓS-PROCESSAMENTO.....	76
TABELA 8 –	DADOS DEMOGRÁFICOS DOS VOLUNTÁRIOS INVESTIGADOS NO ESTUDO.....	79
TABELA 9 –	CÁLCULO E DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS AVALIADOS NO PRESENTE ESTUDO.....	82
TABELA 10 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CUMARINA.....	98

---

---

TABELA 11 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA 7-HIDROXICUMARINA.....	99
TABELA 12 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO O-CUMÁRICO.....	100
TABELA 13 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO CAURENÓICO.....	101
TABELA 14 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS ATRAVÉS DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS POR CLAE-EM/EM.....	103
TABELA 15 –	RECUPERAÇÃO DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E 6-METILCUMARINA OBTIDAS ATRAVÉS EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM <i>TERT</i> -BUTIL METIL ÉTER (TBME), E RECUPERAÇÃO DA PREDNISONA E DOS ÁCIDOS O-CUMÁRICO, CAURENÓICO E ISOFERÚLICO OBTIDAS ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA.....	104
TABELA 16 –	VARIAÇÃO DO FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO (FMN) DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO E ÁCIDO CAURENÓICO CALCULADO PARA AVALIAR O EFEITO MATRIZ.....	105
TABELA 17 –	ESTABILIDADE DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E 6-METILCUMARINA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO.....	106
TABELA 18 –	ESTABILIDADE DOS ÁCIDOS O-CUMÁRICO, CAURENÓICO, ISOFERÚLICO E DA PREDNISONA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO.....	107
TABELA 19 –	RESULTADO DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E ÁCIDO O-CUMÁRICO OBTIDOS EM PLASMA HUMANO APÓS ADMINISTRAÇÃO ORAL DE 60 ML DE XAROPE DE GUACO FORTIFICADO COM 1500 MG DE CUMARINA.....	116

---

---

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 –	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DA CUMARINA SIMPLES (1,2 BENZOPIRONA.....	34
QUADRO 2 –	COMPOSIÇÃO DO XAROPE DE GUACO E TEOR DE CUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO E ÁCIDO CAURENOICO DETERMINADOS NA ESPECIALIDADE.....	60
QUADRO 3 –	PREPARO DO XAROPE DE GUACO FORTIFICADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CUMARINA.....	81

---



---

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1	OBJETIVO GERAL.....	22
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>23</b>
2.1	<i>Mikania glomerata</i> E <i>M. laevigata</i> .....	24
2.2	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA CUMARINA (1,2 BENZOPIRONA).....	33
2.3	METABOLISMO DA CUMARINA.....	34
2.4	MÉTODOS ANALÍTICOS PROPOSTOS PARA DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS METABOLITOS DO GUACO EM PLASMA.....	36
2.5	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS.....	38
2.6	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO APLICADOS EM ENSAIOS BIOANALÍTICOS.....	41
2.6.1	Extração por precipitação de proteínas.....	41
2.6.2	Extração líquido-líquido.....	42
2.6.3	Extração em fase sólida.....	43
2.7	CONCEITOS BÁSICOS DE FARMACOCINÉTICA.....	44
2.7.1	Absorção no trato gastrointestinal.....	44
2.7.2	Efeito de primeira passagem.....	47
2.7.3	Biodisponibilidade.....	48
2.7.4	Distribuição.....	50
2.7.5	Eliminação.....	52
2.7.6	Meia vida de eliminação de um fármaco.....	53
2.7.7	Ordem cinética dos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um fármaco.....	53
2.7.8	Modelos farmacocinéticos.....	54
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
3.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA, PADRÕES ANALÍTICOS, PADRÕES INTERNOS, ESPECIALIDADE FARMACÊUTICA E REAGENTES.....	58
3.2	COMPOSIÇÃO DA ESPECIALIDADE FARMACÊUTICA ADMINISTRADA NOS VOLUNTÁRIOS.....	59
3.3	PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	60
3.4	INSTRUMENTAÇÃO.....	61
3.5	TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR A MELHOR FORMA DE EXTRAIR DO PLASMA OS ANALITOS E OS PADRÕES INTERNOS.....	63
3.6	PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO UTILIZADOS NO PREPARO DAS AMOSTRAS.....	65
3.6.1	Extração da cumarina, 7-hidroxycumarina e 6-metilcumarina (líquido-líquido com <i>tert</i> -butil metil éter).....	65
3.6.2	Extração dos ácidos o-cumárico e caurenóico (precipitação de proteínas com acetonitrila).....	66

---

---

3.7	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS.....	66
3.7.1	Limite de detecção e limite inferior de quantificação .....	66
3.7.2	Seletividade.....	67
3.7.3	Linearidade.....	68
3.7.4	Amostras de controle de qualidade.....	69
3.7.5	Efeito residual.....	71
3.7.6	Precisão e exatidão.....	71
3.7.7	Teste de recuperação.....	72
3.7.8	Efeito matriz.....	72
3.7.9	Teste de estabilidade.....	74
3.7.9.1	Estabilidade de curta duração.....	74
3.7.9.2	Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.....	75
3.7.9.3	Estabilidade de longa duração.....	75
3.7.9.4	Teste de estabilidade pós-processamento.....	76
3.7.9.5	Estabilidade das soluções estoque.....	77
3.7.9.6	Estabilidade das soluções de trabalho.....	77
3.8	SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS.....	78
3.9	DELINEAMENTO DO ESTUDO FARMACOCINÉTICO.....	80
3.10	PREPARO DO XAROPE DE GUACO FORTIFICADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CUMARINA.....	80
3.11	PREPARO DAS AMOSTRAS DE PLASMA DOS VOLUNTÁRIOS.....	81
3.12	ANÁLISE FARMACOCINÉTICA.....	81
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	83
4.1	DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS POR CLAE-EM/EM.....	84
4.2	TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR A MELHOR FORMA DE EXTRAIR DO PLASMA A CUMARINA, A 7-HIDROXICUMARINA E OS ÁCIDOS CAURENÓICO E O-CUMÁRICO.....	92
4.3	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS.....	94
4.3.1	Seletividade.....	94
4.3.2	Limites de detecção e limite inferior de quantificação .....	97
4.3.3	Linearidade.....	97
4.3.4	Teste de efeito residual ( <i>Carry over test</i> ).....	102
4.3.5	Precisão e exatidão.....	103
4.3.6	Teste de recuperação.....	104
4.3.7	Efeito matriz.....	105
4.3.8	Teste de estabilidade.....	105
4.4	ESTUDO FARMACOCINÉTICO DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS DO GUACO E DA 7-HIDROXICUMARINA.....	108
4.4.1	Primeira triagem.....	108
4.4.2	Segunda triagem.....	108

---

---

4.4.3	Estudo farmacocinético da cumarina e de seus metabólitos 7-hidroxycumarina e ácido o-cumárico.....	113
5	<b>CONCLUSÃO.....</b>	121
6	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	124
	<b>ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>	139
	<b>ANEXO 2 – PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS INDIVIDUAIS.....</b>	142
	<b>ANEXO 3 – ARTIGOS PUBLICADOS.....</b>	158

---

---

# ***1. INTRODUÇÃO***

---

*Mikania glomerata* e *M. laevigata*, popularmente conhecidas como guaco, são espécies medicinais amplamente utilizadas para o tratamento de problemas respiratórios nos quais sejam benéficas suas ações broncodilatadora, anti-inflamatória e antiespasmódica (NEVES; SÁ, 1991; BIGUETTI, 1999). Na medicina tradicional as folhas de guaco são muito utilizadas principalmente na forma de chás, porém devido à importância terapêutica dessas espécies diversos produtos a base de guaco vem sendo desenvolvidos e comercializados no Brasil. Em especial o xarope e a solução oral de guaco são utilizados em larga escala pela população brasileira, pois além de livre comércio nas farmácias de dispensação, essas especialidades são distribuídas gratuitamente através de diversos programas de fitoterapia disseminados em todo o Brasil (BRASIL, 2007; GASPARETTO *et al.*, 2010).

Os efeitos terapêuticos do guaco são atribuídos a alguns de seus principais metabólitos, como por exemplo, o ácido o-cumárico, que associado à cumarina reduziu o número de leucócitos e eosinófilos presentes no tecido pulmonar de camundongos com pneumonite alérgica induzida. Esse resultado levou a conclusão de que ambos, cumarina e ácido o-cumárico fazem parte do fitocomplexo responsável pelas atividades terapêuticas do guaco (SANTOS *et al.*, 2006).

Outro metabólito que vem despertando interesse por parte dos pesquisadores é o ácido caurenóico, o qual reduziu a atividade inflamatória de macrófagos RAW264.7 através da inibição da síntese do óxido nítrico ( $IC_{50} = 51,7 \mu M$ ), liberação da prostaglandina  $E_2$  ( $IC_{50} = 106,0 \mu M$ ) e expressão da atividade ciclooxigenase 2 (COX-2) ( $IC_{50} = 3,5 \mu g/mL$ ) (CHOI *et al.*, 2011). Em doses acima de  $10 \mu M$  o ácido caurenóico também promoveu relaxamento da aorta de ratos pré-contráida com fenilefrina ou cloreto de potássio (TIRAPELLI *et al.*, 2002, 2004).

Apesar da relevância terapêutica dos ácidos o-cumárico e caurenóico, a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura atribuem os efeitos benéficos do guaco à cumarina (1,2 benzopirona), a qual é definida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA) como o marcador químico do guaco (BRASIL, 2008b). Dentre as principais propriedades terapêuticas da cumarina destaca-se o efeito broncodilatador observado em porquinhos-da-índia que receberam dose adequada média ( $AD_{50}$ ) de 75 mg/kg do ativo. Esse resultado sugere efeito broncodilatador da cumarina para casos de inflamações crônicas das vias aéreas superiores (RAMANITRAHASIMBOLA *et al.*, 2005).

---

O uso da cumarina em humanos é reportado de longa data, e por esse motivo, diversos estudos foram conduzidos para estabelecer o seu metabolismo. Os estudos demonstraram que no fígado a cumarina é extensivamente metabolizada em 7-hidroxicumarina (Fase I), a qual em seguida sofre reação de conjugação (Fase II), sendo biotransformada em 7-hidroxicumarina glucoronida (LACY; O'KENNEDY, 2004). A 7-hidroxicumarina é considerada o principal metabólito *in vivo* da cumarina e estudos conduzidos em camundongos demonstraram que a 7-hidroxicumarina (60 mg/kg) pode reduzir consideravelmente a inflamação alérgica das vias aéreas superiores (VASCONCELOS *et al.*, 2009), atividade que contribui diretamente com o efeito broncodilatador do guaco.

Conforme demonstrado, a cumarina, a 7-hidroxicumarina e os ácidos o-cumárico e caurenóico estão diretamente relacionados com os efeitos benéficos do guaco, porém além dos benefícios alguns estudos apontam que essas substâncias podem ser tóxicas. Um exemplo é o ácido caurenóico que *in vitro* promoveu a hemólise de eritrócitos humanos e de camundongos (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002). O ácido caurenóico também induziu quebra de DNA e causou genotoxicidade em fibroblastos de pulmão de hamster, além de promover anomalia citogenética em leucócitos humanos e efeito genotóxico no fígado, rim e baço de camundongos (CAVALCANTI *et al.*, 2006, 2010).

A cumarina também é relatada como uma substância potencialmente tóxica, especialmente carcinogênica para o fígado e pulmão de ratos e camundongos (LAKE, 1999). Esses animais quando submetidos a longas exposições com cumarina apresentaram modificações bioquímicas e hematológicas, além de úlceras, necroses, fibroses e alterações citológicas (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1993). Para humanos, a maioria dos testes de mutagenicidade e genotoxicidade sugere que a cumarina não é tóxica. Esse fato é atribuído ao mecanismo de detoxificação que em humanos ocorre via da 7-hidroxilação, e em ratos e camundongos via 3,4-epoxidação, resultando na formação de metabólitos mais tóxicos (LAKE, 1999).

Considerando que os efeitos tóxicos e terapêuticos dos principais metabólitos do guaco são dose dependente, e que o teor desses compostos não é padronizado nos fitoterápicos disponíveis comercialmente (GASPARETTO *et al.*, 2011a; 2011b), determinar a farmacocinética da cumarina, 7-hidroxicumarina, ácido o-cumárico e ácido caurenóico em humanos é de extrema relevância, principalmente para que a

---

meia vida de eliminação dessas substâncias seja conhecida, e a correta posologia do xarope seja determinada de modo a garantir níveis plasmáticos suficientes dessas substâncias para que o efeito broncodilatador seja alcançado

O presente trabalho visa o estudo farmacocinético da cumarina, 7-hidroxycumarina, ácido o-cumárico e ácido caurenóico, após a administração de xarope de guaco em voluntários humanos. O objetivo desse estudo é compreender o comportamento farmacocinético dessas substâncias, e a partir de então estabelecer as bases para futuros estudos clínicos que avaliem a real efetividade do xarope de guaco.

### 1.1. OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo farmacocinético da cumarina, ácido o-cumárico, ácido caurenóico e 7-hidroxycumarina após a administração do xarope de guaco em voluntários humanos sadios.

### 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar métodos por CLAE-EM/EM capazes de determinar em plasma a cumarina, o ácido o-cumárico, o ácido caurenóico e a 7-hidroxycumarina;
  - Determinar o perfil farmacocinético da cumarina, 7-hidroxycumarina, ácido o-cumárico e ácido caurenóico em voluntários sadios após a administração de um xarope comercial de guaco;
  - Determinar o perfil farmacocinético da cumarina, 7-hidroxycumarina e ácido o-cumárico em voluntários sadios após a administração do xarope comercial de guaco fortificado com cumarina.
-

---

## ***2. REVISÃO DA LITERATURA***

---



## 2.1 *Mikania glomerata* E *M. laevigata*

A família Asteraceae compreende aproximadamente 1500 gêneros e 23000 espécies, no qual está inserido o gênero *Mikania* que abrange cerca de 430 espécies distribuídas principalmente em regiões neotropicais (JUDD *et al.*, 1999). No Brasil 171 espécies já foram catalogadas as quais são distribuídas principalmente nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (ANGELY, 1965; OLIVEIRA, 1972; HOLMES, 1995; RITTER; MIOTTO, 2005).

Dentre as principais plantas pertencentes ao gênero *Mikania* encontram-se a *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, ambas oficializadas na Farmacopeia Brasileira (Farmacopeia Brasileira, 1929; 2005). Essas espécies são encontradas principalmente na Floresta Atlântica do Brasil, desde o estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul, podendo ainda ser encontradas na Bahia, Paraguai e noroeste da Argentina (MORAES, 1997; LIMA, 2003b; FREIRE *et al.*, 2006).

*M. glomerata* (Figura 1) e *M. laevigata* (Figura 2) são conhecidas como guaco e apresentam características químicas, morfológicas e organolépticas semelhantes. A principal diferença entre as espécies é o período de floração, que ocorre em janeiro para *Mikania glomerata* e em setembro para *M. laevigata*. Por compartilharem o mesmo habitat, essas espécies dificilmente são distinguidas, e por isso são utilizadas na medicina tradicional sem distinção (OLIVEIRA *et al.*, 1986a; LIMA; BIASI, 2002).

O guaco tem uma longa história de uso, e na medicina tradicional é muito utilizado por suas propriedades antiespasmódica, excitante, antiasmática, anti-inflamatória, tônica, depurativa, antipirética, antiofídica, balsâmica, expectorante, antimalárica e estimulante do apetite. O guaco é também utilizado contra picada de escorpião, artrite, reumatismo, eczema pruriginoso, inflamação da garganta e principalmente para o tratamento da gripe e de doenças respiratórias (COIMBRA, 1942; LUCAS, 1942; RUPPELT *et al.*, 1991; GALVANI; BARRENECHE, 1994; ALICE *et al.*, 1995; CORTEZ; JACOMOSI; CORTEZ, 1999; MATOS, 2000; PEREIRA; OLIVEIRA; LEMOS, 2004; MAIORANO *et al.*, 2005; SOUZA; FELFILI, 2006; VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006; BOTSARIS, 2007). Em virtude dessas atribuições o xarope e solução oral de guaco foram incluídos no elenco de referência de medicamentos da rede de atenção básica em saúde, conforme descrito no anexo



FIGURA 1 – *Mikania Glomerata* Spreng. Fonte: NAPIMOGA; YATSUDA, 2010.



FIGURA 2 – *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker. Fonte: JARDIM DE FLORES, 2012

---

II da Portaria nº 3.237 de 24 de dezembro de 2007 (BRASIL, 2007). Dessa forma, os fitoterápicos a base de guaco vem sendo utilizados em larga escala pela população brasileira através da implantação de diversos programas de fitoterapia disseminados em todo o Brasil (BRASIL, 2006a, 2008a; GASPARETTO *et al.*, 2010).

Devido à importância do guaco na medicina tradicional, diversos estudos foram conduzidos com a finalidade de comprovar o potencial terapêutico de seus extratos medicinais. Um exemplo foi um estudo conduzido com o extrato aquoso das folhas, raízes e caules, que demonstrou que os efeitos tóxicos, inflamatórios e enzimáticos do veneno das serpentes *Bothrops* e *Crotalus* podem ser inibidos com a utilização desse preparado. O extrato aquoso de guaco também foi efetivo na redução da atividade hemorrágica causada pelas serpentes *Bothrops alternatus*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops jararacussu* (MAIORANO *et al.*, 2005).

O extrato aquoso de guaco também apresentou atividade analgésica em camundongos com peritonite induzida por ácido acético 0,1N. Após 30 min da indução da inflamação, uma redução de 63% no número de contorções desses animais foi observada com uma dose oral de 10 mg/kg do extrato (RUPPELT *et al.*, 1991). No modelo de edema induzido por carregenina em pata de ratos foi observado uma redução significativa da inflamação mediante tratamento oral de 400 mg/kg do extrato. Nesses animais, a migração de leucócitos também diminuiu 28,26% no local da lesão, demonstrando que o extrato aquoso de guaco pode ser eficaz no tratamento de processos inflamatórios (SUYENAGA *et al.*, 2002).

O extrato aquoso de guaco também promoveu atividade antidiarrêica em camundongos que receberam via oral uma dose de 1000 mg/kg do extrato. Nesse estudo uma redução de mais de 65% na distância percorrida do marcador (carvão ativo) foi observada no intestino dos animais que receberam o extrato, resultado considerado promissor tendo em vista que o medicamento de referência (loperamida) reduziu aproximadamente 62% da distância percorrida pelo carvão (SALGADO; RONCARI; MOREIRA, 2005).

Resultados promissores também foram observados em ensaios realizados com os extratos hidroalcoólicos de guaco. Análises histológicas conduzidas em ratos que receberam instilação intratraqueal de pó de carvão demonstraram que tratamentos com esse extrato (dose subcutânea, 100 mg/kg) podem reduzir

---

significativamente as injúrias oxidativas causadas pela exposição ao carvão (FREITAS *et al.*, 2008). No modelo de camundongos com peritonite induzida por carragenina a administração subcutânea do extrato hidroalcoólico de guaco (3 mg/kg) promoveu atividade anti-edematogênica. Nesse caso, uma redução significativa da adesão de leucócitos nos tecidos inflamados também foi observada, a que tudo indica, através da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias presentes no local da inflamação (ALVES *et al.*, 2009).

A capacidade do extrato hidroalcoólico de guaco em diminuir lesões ulcerativas também foi comprovada em ratos que receberam via oral uma dose de 1000 mg/kg da preparação. Nesse estudo uma redução de 50% nas lesões ulcerativas produzidas por reserpina foi observada, com níveis efetivos claramente evidenciados em lesões causadas por estresse hipotérmico (82%), indometacina (85%) e etanol (93%) (BIGHETTI *et al.*, 2005).

No que diz respeito às propriedades do extrato hidroalcoólico de guaco no trato respiratório, estudos *in vitro* demonstraram que a preparação é efetiva no relaxamento do epitélio traqueal de ratos pré-contráído com a acetilcolina. Nesse estudo, a concentração média eficaz calculada ( $EC_{50}$ ) foi de aproximadamente 1400  $\mu$ g/mL com um efeito máximo ( $E_{max}$ ) observado de 95%. O mecanismo de relaxamento também foi estabelecido, levando à conclusão de que a atividade anti-espasmódica do guaco não depende de substâncias derivadas do epitélio, mas envolve mudanças na mobilização do cálcio celular (GRACA *et al.*, 2007a).

Os efeitos dos extratos hidroalcoólicos das folhas de guaco também foram investigados em traquéias isoladas de porquinhos-da-Índia. O resultado foi uma inibição significativa na contração dos tecidos isolados pré contraídos com histamina ( $IC_{50}$ = 0,34 mg/mL), acetilcolina ( $IC_{50}$ = 0,72 mg/mL) ou potássio ( $IC_{50}$ = 1,41mg/mL). O extrato hidroalcoólico de guaco também foi efetivo no relaxamento de brônquios humanos pré-contráídos com potássio. O estudo demonstrou que esse relaxamento é dose-dependente ( $IC_{50}$ = 0,34 mg/mL), apoiando a indicação de que o guaco pode ser eficaz para o tratamento de doenças respiratórias onde a broncoconstrição esteja presente (SOARES DE MOURA *et al.*, 2002).

De um modo geral as propriedades terapêuticas do guaco são atribuídas a alguns dos seus principais metabólitos secundários (GASPARETTO; de FRANCISCO; PONTAROLO, 2013). Um exemplo é o ácido o-cumárico, que

---

associado à cumarina (1,2 benzopirona) reduziu o número de leucócitos e eosinófilos presentes no tecido pulmonar de camundongos com pneumonite alérgica induzida. Esse resultado levou a conclusão de que ambos, cumarina e ácido *o*-cumárico são parte do fitocomplexo responsável pelas atividades terapêuticas do guaco (SANTOS *et al.*, 2006).

Outro metabólito do guaco que vem despertando interesse por parte dos pesquisadores é o ácido caurenóico, o qual reduziu a atividade inflamatória de macrófagos RAW264.7 através da inibição da síntese do óxido nítrico ( $IC_{50} = 51,73 \mu M$ ), liberação da prostaglandina  $E_2$  ( $IC_{50} = 106,09 \mu M$ ) e expressão da atividade ciclooxigenase 2 (COX-2) ( $IC_{50} = 3,5 \mu g/mL$ ). No modelo de edema induzido por carregenina em pata de camundongos o ácido caurenóico (50 mg/kg) reduziu 34,4% do edema ocorrido 5 h após a indução da inflamação (CHOI *et al.*, 2011). Em doses acima de 10 mM, o ácido caurenóico promoveu relaxamento do endotélio íntegro ou anéis da aorta de ratos pré-contraídos com fenilefrina e cloreto de potássio (TIRAPELLI *et al.*, 2002, 2004).

Embora os resultados obtidos com os ácidos *o*-cumárico e caurenóico sejam promissores, a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura atribuem os efeitos benéficos do guaco à cumarina (1,2 benzopirona), a qual é definida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA) como o marcador químico do guaco (BRASIL, 2008b). De acordo com a ANVISA a dose diária de cumarina pode variar entre 0,5 a 5,0 mg (BRASIL, 2008b).

A cumarina é clinicamente utilizada para o tratamento de diversas patologias, principalmente como agente anticoagulante e antitrombótico. Em combinação com a troxerrutina a cumarina é utilizada no tratamento de todos os estados de estase venosa, como, por exemplo, varizes, síndrome pós-trombótica, hemorroidas, edemas estáticos, dentre outros (GASPARETTO *et al.*, 2012). Quando administrada no duodeno de ratos (100 mg/kg) a cumarina inibiu a secreção ácida produzida por betanecol, sugerindo que essa substância pode influenciar o controle da secreção mediada pelo sistema nervoso parassimpático (BIGHETTI *et al.*, 2005).

A cumarina (100 mg/dia) em combinação com a cimetidina (1200 mg/dia) reduziu a metástase do carcinoma humano sem causar nenhum tipo de efeito colateral (THORNES; LYNCH; SHEEHAN, 1982). Em pacientes com câncer de próstata a cumarina (3 g/dia) estabilizou os níveis de antígeno prostático específico

---

(PSA) por mais de sete anos (LACY; O'KENNEDY, 2004). A cumarina também é responsável pela ativação de macrófagos e células do sistema imunológico (HOULT; PAYA, 1996; LACY; O'KENNEDY, 2004), além de reduzir o edema e o linfedema de pacientes com elefantíase ou submetidos à mastectomia (HOULT; PAYA, 1996). Dentre as principais propriedades terapêuticas da cumarina podemos ainda destacar o efeito relaxante observado em traqueia de porquinho-da-índia precontraída com histamina ( $EC_{50} = 35,0 \mu\text{g/mL}$ ) ou carbacol ( $EC_{50} = 33,4 \mu\text{g/mL}$ ). Nesses animais a dose adequada média que promoveu *in vivo* resistência contra a histamina inalada foi de 75 mg/kg. Esses resultados que sugere efeito broncodilatador em inflamações crônicas das vias aéreas superiores (RAMANITRAHASIMBOLA *et al.*, 2005).

O uso da cumarina é reportado de longa data, e por esse motivo, diversos estudos foram conduzidos com o objetivo de compreender o seu comportamento no organismo. No metabolismo de primeira passagem (Fase I) a cumarina é rapidamente convertida em 7-hidroxycumarina através de um citocromo P450 específico (CYP2A6). No metabolismo de fase II a 7-hidroxycumarina sofre reação de conjugação, convertendo-se em 7-hidroxycumarina glucoronida, a qual é rapidamente eliminada pela urina (O'KENNEDY; THORNES; 1997; WANG *et al.*, 2005).

A 7-hidroxycumarina é considerada o principal metabólito *in vivo* da cumarina, e alguns estudos apontam que essa substância é o fármaco efetivo, enquanto que sua precursora, a cumarina, apenas um pró-fármaco (LACY; O'KENNEDY, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2009). Dentre as principais atividades da 7-hidroxycumarina podemos citar a atenuação de processos inflamatórios alérgicos das vias aéreas superiores de camundongos (60 mg/kg) (VASCONCELOS *et al.*, 2009), atividade que está diretamente relacionada com o efeito broncodilatador do guaco

Diversas pesquisas também foram realizadas com o intuito de avaliar a toxicidade dos extratos, fitoterápicos e metabólitos isolados de guaco. Quando administrado em ratos no ciclo espermatogênico o extrato hidroalcoólico e o xarope de guaco não promoveram quaisquer alterações na ingestão alimentar, produção de gametas, níveis de testosterona sérica e corpo e peso do órgão reprodutor (SÁ *et al.*, 2003; GRACA *et al.*, 2007a). Nesses animais a administração de doses orais (75, 150 e 300 mg/kg) e repetidas do xarope de guaco durante 28 ou 90 dias não promoveu qualquer distúrbio bioquímico, hematológico, hepático, renal e pancreático (GRACA *et al.*, 2007b).

---

---

O extrato hidroalcoólico de guaco não prejudicou a fertilidade de ratos que receberam via oral a dose crônica do extrato (3,3 g/kg) por 52 dias. Nas fêmeas de ratos não foram evidenciadas alterações no acasalamento, na pré-implantação de embriões, no número de embriões implantados, no número de descendentes e no desmame (SÁ *et al.*, 2006). Nos machos o tratamento com extrato hidroalcoólico de guaco não alterou o corpo e o peso do órgão reprodutor, e não interferiu na produção de gametas, níveis séricos de testosterona e ingestão de alimentos (SÁ *et al.*, 2003). Os resultados obtidos com ratos machos que receberam extrato hidroalcoólico de guaco durante 90 dias também demonstraram ausência de toxicidade na fertilidade desses animais, pois nenhuma mudança significativa foi observada no corpo e peso do órgão reprodutor, na concentração do gameta, no nível de testosterona e no consumo de alimentos (SÁ; LEITE; ALMEIDA, 2010).

O extrato etanólico de guaco não promoveu qualquer efeito sobre o ganho no peso corporal de camundongos que receberam durante 14, 28 ou 60 dias doses repetidas de 3 mg/kg do extrato. O estudo também concluiu que o potencial tóxico do extrato etanólico é baixo, pois não foram observadas alterações nos parâmetros hematológicos, renais, hepáticos e biliares desses animais (ALVES *et al.*, 2009).

A atividade antimutagênica do extrato aquoso de guaco foi avaliada através do teste Salmonella/Microsoma e os resultados apresentaram uma alta percentagem de inibição mutagênica induzida por 2-aminofluoreno na presença de metabolismo exógeno (Fração S9), e nas lesões por substituição de pares de bases (TA100) (FERNANDES; VARGAS, 2003). Em contrapartida, os ensaios realizados através do teste do cometa demonstraram que os extratos aquosos e hidroalcoólicos de guaco podem promover efeitos deletérios, uma vez que danos ao DNA foram observados em hepatócitos de ratos. Análises conduzidas através do teste de micronúcleo também demonstraram que o extrato aquoso do guaco pode promover genotoxicidade, demonstrando que o guaco deve ser utilizado com certa precaução (COSTA *et al.*, 2008).

Cuidados especiais também foram recomendados com a utilização de extratos liofilizados de guaco. Em camundongos com pneumonite alérgica induzida e tratados com o extrato liofilizado foi observado hemorragia de tecido pulmonar, fato que não ocorreu com os animais tratados com o extrato hidroalcoólico bruto. Esse

---

resultado levou a conclusão que a liofilização pode alterar algum efeito protetor do extrato hidroalcoólico de guaco (SANTOS *et al.*, 2006).

Testes de toxicidade revelaram que o extrato hidroalcoólico de guaco também pode causar efeito hemolítico dose-dependente. Em eritrócitos de carneiro incubados 120 min com 100, 500 e 1000 µg/mL do extrato foram evidenciadas respectivamente 25, 50 e 75% de hemólise. No entanto esse efeito não foi considerado significativo, pois nas concentrações de 100 e 500 µg/mL nenhum efeito foi observado em eritrócitos incubados por 60 minutos (LUIZE *et al.*, 2005).

Problemas de toxicidade também são reportados aos metabólitos isolados do guaco, caso do ácido caurenóico que inibiu a clivagem de ovos de ouriço do mar, e progressivamente induziu a destruição de seus embriões. O ácido caurenóico também induziu quebra de DNA e anomalias citogenéticas em leucócitos humanos, além de apresentar efeito genotóxico positivo em fibroblastos de pulmão de hamster, e no fígado, rim e baço de camundongos (CAVALCANTI *et al.*, 2006, 2010). O ácido caurenóico também induziu efeito hemolítico dose-dependente em eritrócitos de ratos e de humanos, com EC<sub>50</sub> de 74,0 e 56,0 µM, respectivamente (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002).

A cumarina também é mencionada como uma substância tóxica, porém o nível de toxicidade pode variar consideravelmente de acordo com a espécie estudada. Em babuínos que receberam por 2 anos uma dieta variada de cumarina (0 a 67,5 mg/kg/dia) não foi observado sinais de alterações bioquímicas e histoquímicas. No entanto, um aumento relativo no peso do fígado e dilatações do retículo endoplasmático foram evidenciados quando doses mais elevadas de cumarina foram administradas nesses animais (FELTER *et al.*, 2006).

Grupos de ratos e camundongos que receberam uma dieta de cumarina em diferentes períodos de exposição apresentaram aumento no número de eritrócitos, redução da hemoglobina, redução no tempo de tromboplastina, aumento de plaquetas, hiperplasia da glândula paratireóide, úlceras, fibroses, aumento nos níveis de bilirrubinas, hiperplasia do duto biliar, degeneração e necrose do fígado. Em alguns animais a administração de cumarina levou a morte. Sob longas exposições (2 anos) a presença de tumor também foi observada no fígado e pulmão desses roedores, porém a relação dose-resposta não foi linear. O tumor foi

---



observado apenas em animais com problemas pulmonares ou hepáticos que receberam altas doses de cumarina (LAKE, 1999).

Em humanos, a maioria dos testes mutagênicos e de genotoxicidade sugerem que a cumarina não é tóxica. Esse fato é atribuído ao mecanismo de detoxificação da cumarina, que em humanos utiliza preferencialmente a via da 7-hidroxilação, uma rota menor em ratos e camundongos que utilizam a via da 3,4-epoxidação, resultando na formação de metabólitos mais tóxicos (Figura 3) (LAKE, 1999).

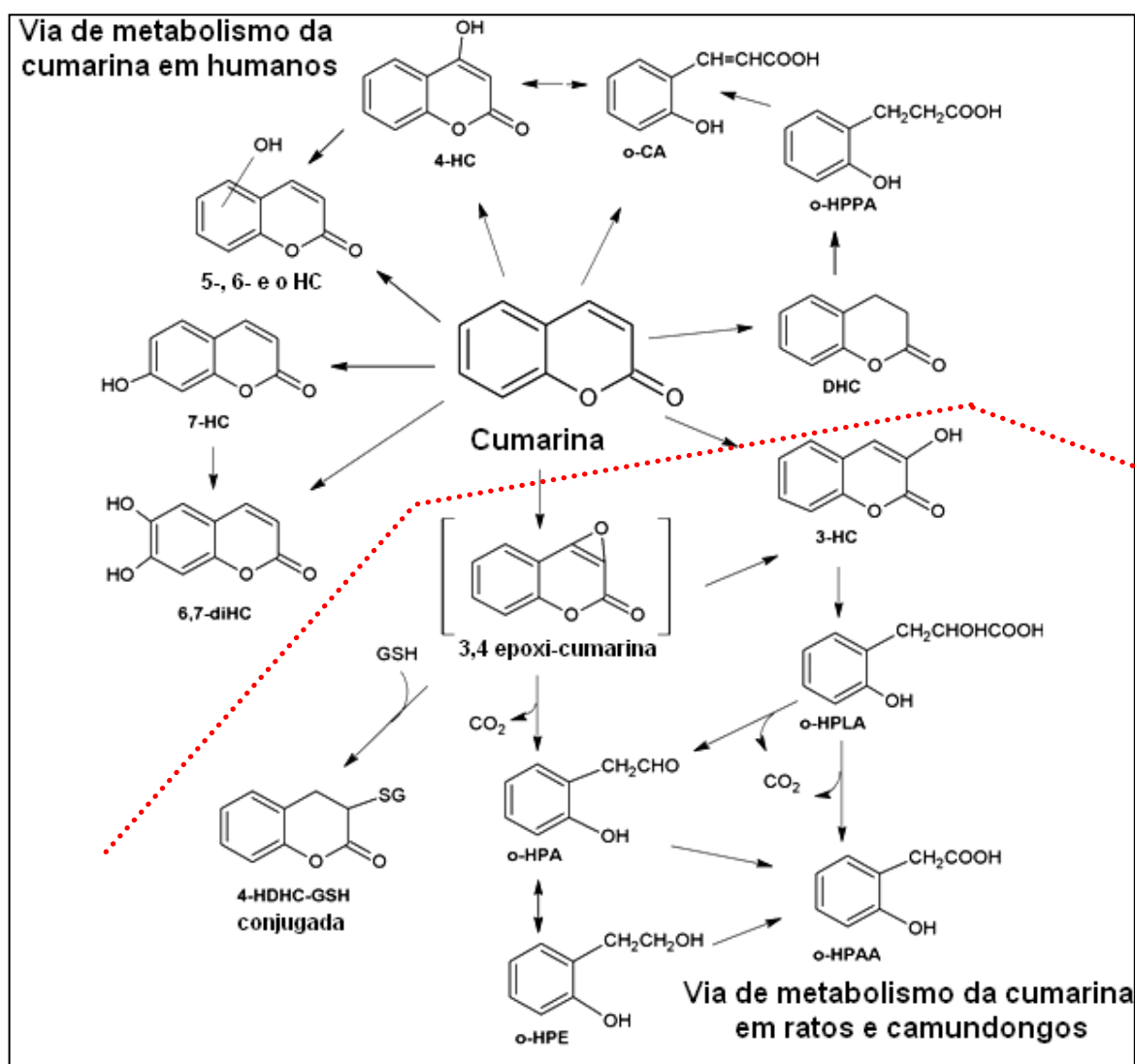


FIGURA 3 – ROTAS DE METABOLISMO DA CUMARINA EM HUMANOS, RATOS E CAMUNDONGOS. Dados: dihidrocumarina (DHC); ácido o-hidroxifenilpropionico (O-HPPA); ácido o-cumarico (O-CA); 7-hidroxycumarina glicosilada (7-HC-GLUC); 3, 4, 5, 6, 7 e 8-hidroxycumarina (HC); 6,7-dihidroxycumarina (6,7-DIHC); ácido o-hidroxifenilático (O-HPLA); ácido o-hidroxifenilacético (O-HPAA); o-hidroxifenilacetaldeído (O-HPA); o-hidroxifeniletanol (O-HPE); 4-hidroxidihidrocumarina-glutationa-conjugada (4-HDHC-GSH). Fonte: Adaptado de (LACY; O'KENNEDY, 2004)

Em relação ao mecanismo de detoxificação dos demais metabólitos do guaco, não há relatos na literatura que contemplem essa informação. Também é importante mencionar que em humanos, apenas dois estudos clínicos de fase I foram realizados para avaliar a segurança clínica de xaropes contendo guaco. Por mais de 20 dias alguns voluntários receberam doses do fitoterápico (15 mL, quatro vezes ao dia), e após o tratamento nenhuma alteração clínica foi observada. Apenas em alguns casos pequenas variações bioquímicas, hematológicas e sorológicas ocorreram, mas nenhum dos voluntários apresentou níveis superiores aos limites estabelecidos. Apenas dois voluntários relataram sonolência leve durante o tratamento, e um deles relatou náusea e diarreia. Em relação a esses estudos, em nenhum momento ficou claro que os efeitos adversos foram causados pela ingestão do guaco, pois os fitoterápicos utilizados eram associações de plantas onde o extrato de guaco era componente minoritário (SOARES *et al.*, 2006; TAVARES *et al.*, 2006).

## 2.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA CUMARINA (1,2 BENZOPIRONA)

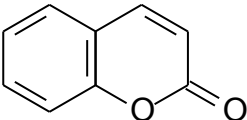
As cumarinas compreendem uma grande classe de compostos presentes em todo o reino vegetal. Essas substâncias são encontradas nas frutas, chás, sementes, vinhos e outros alimentos, o que demonstra que humanos estão expostos a dieta com essas substâncias (LACY; O'KENNEDY, 2004).

A 1,2 benzopirona, também conhecida como cumarina simples, é uma das cumarinas mais estudadas pela comunidade científica. Essa substância é muito utilizada como fragrância para perfumes e sabonetes, sendo muito comum o seu uso para melhorar as características organolépticas de algumas bebidas alcoólicas. A cumarina também é utilizada para fins terapêuticos, sendo apontada como o principal metabólito responsável pelos efeitos broncodilatadores do guaco. Conhecer as propriedades físico-químicas da cumarina (principal objeto de nosso estudo) é, portanto de grande relevância antes da condução do seu estudo farmacocinético, principalmente porque a velocidade/extensão com que essa substância é absorvida depende de algumas características como solubilidade, coeficiente de partição e

---

massa molar (LABAUNE, 1993). As propriedades físico-químicas e as características organolépticas da cumarina (1,2 benzopirona) encontram-se sumarizadas no Quadro 1:

QUADRO 1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DA CUMARINA SIMPLES (1,2 BENZOPIRONA)

Nome	1,2 benzopirona, 2H-1-benzopirona-2-um, ácido cis-o-lactona cumarínico, anidrido cumarínico, e outros
Cor / forma	Cristal branco ou quase branco (em linha). Também pode ser encontrada na forma de pó ou escamas.
Odor / sabor	Odor perfumado semelhante ao de baunilha. Sabor amargo e aromático.
Fórmula molecular	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>
Peso molecular	146,15 g/mol
Estrutura química	
Ponto de fusão	68 – 70 °C
Ponto de ebulição	297 a 301,7 °C
Coeficiente de partição (octanol:água)	Log K <sub>o/w</sub> : 1,39
Solubilidade	Solúvel em etanol e em solventes aquosos alcalinos, oxigenados e clorados. Muito solúvel em clorofórmio, éter etílico e óleos. Ligeiramente solúvel em água (1,9 mg/L a 20 °C)

Fonte: PubChem Compound (2013) e (LAKE, 1999)

## 2.3 METABOLISMO DA CUMARINA

A cumarina é vista tradicionalmente como o modelo ideal para estudar o complexo metabolismo de uma molécula orgânica estruturalmente simples e, como tal, o seu destino metabólico tem sido pesquisado em diferentes espécies (ratos,

camundongos, macacos e homem). Os estudos demonstraram que após a administração da cumarina diversos metabólitos podem ser formados, porém as vias de metabolismo bem como os metabólitos formados dependem de cada espécie (LACY; O'KENNEDY, 2004).

A cumarina tem elevado coeficiente de partição (Quadro 1) e esse fato é considerado favorável para uma rápida absorção. Isso combinado com o fato de que a cumarina é um composto não polar sugere fácil transporte pelas bicamadas lipídicas celulares (difusão passiva), o que justifica a completa absorção da cumarina pela membrana intestinal (LACY; O'KENNEDY, 2004).

Após a absorção a cumarina atinge o fígado onde praticamente toda a dose administrada (> 94%) sofre metabolismo de primeira passagem (RITSCHER *et al.*, 1977; RITSCHER; BRADY; TAN, 1979; RITSCHER *et al.*, 1981). No metabolismo de Fase I a cumarina é extensivamente metabolizada em 7-hidroxicumarina através de citocromo P450 específico (CYP2A6). No metabolismo de Fase II a 7-hidroxicumarina sofre reação de conjugação, sendo biotransformada em 7-hidroxicumarina glucoronida, a qual é prontamente eliminada pela urina (LACY; O'KENNEDY, 2004). A via da 7-hidroxilação é considerada a principal rota de metabolismo da cumarina em humanos, todavia a formação de outros metabólitos como dihidroxicumarina, ácido o-hidroxifenilpropionico, ácido o-cumarico, 6,7-dihidroxicumarina e 3, 4, 5, 6, 7 e 8-hidroxicumarina também é reportada na literatura, porém de forma minoritária (Figura 3, página 30).

Da cumarina administrada apenas uma pequena fração atinge intacta a circulação sistêmica. Os estudos farmacocinéticos apontam que a disponibilidade da cumarina na circulação sistêmica é < 6%, sendo o restante do administrado encontrado disponível principalmente na forma de 7-hidroxicumarina e 7-hidroxicumarina glucoronida (>60%) (RITSCHER *et al.*, 1977; RITSCHER *et al.*, 1981; RAUTIO *et al.*, 1992; ISCAN *et al.*, 1994; LACY; O'KENNEDY, 2004; ABRAHAM *et al.*, 2011). Esse fato associado à rapidez com que esses metabólitos são formados levou à conclusão de que no fígado a cumarina sofre metabolismo sequencial (RITSCHER *et al.*, 1977).

Apenas 35% da cumarina e 47% da 7-hidroxicumarina que atingem a circulação sistêmica se ligam a proteínas plasmáticas. Sendo assim a disponibilidade desses compostos no tecido alvo não deve ser problemática, pois as

---

porporções de cumarina e 7-hidroxycumarina ligadas encontram-se bem abaixo do valor crítico aceitável de 80% (RITSCHER *et al.*, 1981). Estudos também demonstraram que a cumarina é amplamente distribuída no organismo, e que seu metabólito glucoronado (7-hidroxycumarina glucoronida) atinge todos os órgãos, exceto o cérebro (RITSCHER *et al.*, 1977,1981). Não há indícios de acúmulo significativo da cumarina ou seus metabólitos nos tecidos (LAKE, 1999).

Estudos farmacocinéticos conduzidos com voluntários humanos também demonstraram que a velocidade de depuração total da 7-hidroxycumarina glucoronida é 10 vezes maior que a velocidade da filtração glomerular. Esse resultado indica que a principal via de eliminação da cumarina (>80%) é através da secreção tubular ativa do seu metabólito glucoronado (7-hidroxycumarina glucoronida) (RITSCHER *et al.*, 1977). A presença do ácido o-hidroxifenilacético também foi detectada na urina de humanos, porém a taxa de excreção dessa substância foi < 6% (SHILLING; CRAMPTON; LONGLAND, 1969; MEINEKE *et al.*, 1998). O ácido o-hidroxifenilacético é inibidor da glucose 6-fostatase, uma enzima que em quantidades reduzidas pode causar danos ao fígado (SHILLING; CRAMPTON; LONGLAND, 1969). Assim justifica-se a toxicidade da cumarina observada em ratos, camundongos e coelhos, pois a rota metabólica majoritária da cumarina nesses animais resulta na excreção do ácido o-hidroxifenilacético, uma rota considerada minoritária para humanos (SHILLING; CRAMPTON; LONGLAND, 1969). Não há relatos da presença de cumarina livre na urina de humanos.

## 2.4 METODOS ANALÍTICOS PROPOSTOS PARA DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS METABOLITOS DO GUACO EM PLASMA

Nos últimos anos a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) se tornou uma das técnicas de separação mais utilizadas para fins qualitativos e quantitativos. As razões para esse crescimento estão na sensibilidade e na seletividade da técnica, com destaques em determinações ambientais, médicas e principalmente na indústria farmacêutica (TONHI *et al.*, 2002).

O princípio de separação do CLAE é baseado nas características físico-químicas de cada composto e uma ou mais interações entre o soluto e uma fase

---

estacionária (CASS; DEGANI, 2001). Os detectores do CLAE são os mais variados e a escolha do sistema de detecção depende da finalidade do estudo. Assim, parâmetros como alta sensibilidade, seletividade, rapidez de resposta, linearidade e estabilidade frente a mudanças de temperatura e composição da fase móvel caracterizam a escolha do detector. Os sistemas de detecção mais utilizados no CLAE são os detectores de arranjo de fotodiodos (PDA), fluorescência (FLD), índice de refração (IR) e o analisador de massas (EM). Este último tornou-se uma das ferramentas analíticas mais utilizadas nos últimos anos, pois o EM pode fornecer a massa molecular dos solutos e contribuir com a elucidação estrutural de moléculas (CASS; DEGANI, 2001). Além disso, o acoplamento do CLAE com o EM (CLAE-EM) se tornou a técnica de quantificação mais comum em ensaios bioanalíticos, especialmente pela sua notável sensibilidade (WAL *et al.*, 2010).

Outra grande vantagem de se acoplar o CLAE a um analisador de massas - especialmente o do tipo triplo quadrupolo - está nos recursos de análise sequencial, também conhecida como espectrometria de massas e recursos *in tandem* (EM-EM). Devido a excelência na especificidade e na sensibilidade deste recurso, a espectrometria de massas teve um aumento considerável de aplicações nas últimas décadas, e se tornou a técnica analítica mais difundida em estudos de biodisponibilidade (CASS; DEGANI, 2001; KORFMACHER, 2005).

Para a determinação em plasma da cumarina e da 7-hidroxicumarina diversos métodos analíticos foram propostos, no entanto alguns desses métodos determinam essas substâncias separadamente (RITSCHER *et al.*, 1976; EGAN; O'KENNEDY, 1993; ABRAHAM *et al.*, 2011), ou quando determinam simultaneamente, utilizam CLAE com detector de arranjo de diodos, uma técnica que apresenta moderada sensibilidade, restrita seletividade e corridas longas que utilizam alto consumo de solventes (RITSCHER *et al.*, 1977; RITSCHER; HOFFMAN, 1981; EGAN; O'KENNEDY, 1992; LAMIABLE *et al.*, 1993; BOGAN; O'KENNEDY, 1996; FORD *et al.*, 2001). Além disso, nenhum dos métodos desenvolvidos para determinação dessas substâncias foi devidamente validado, o que implica na credibilidade dos resultados. Como também não há dados disponíveis na literatura para quantificação em plasma dos ácidos o-cumárico e caurenóico, o desenvolvimento e a validação de métodos por CLAE-EM/EM para determinação da cumarina, 7-hidroxicumarina,

---

ácido o-cumárico e ácido caurenóico é justificada antes condução do estudo farmacocinético.

## 2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Cada método analítico tem sua particularidade e está sujeito a efeitos da matriz e as variações provenientes das características de cada analito. Logo, para que a correta interpretação dos seus resultados seja alcançada, é primordial garantir a qualidade nas análises de modo que esses métodos sejam reproduzíveis e confiáveis (SHAH, 2007). Todavia, otimizações não garantem o desempenho de um método, sendo necessárias ações que demonstrem sua adequabilidade (IUPAC, 1995). Assim, é essencial que os princípios de validação dos métodos bioanalíticos sejam estabelecidos e aplicados de acordo com a orientação de órgãos regulamentadores (SHAH, 2007).

A definição dos parâmetros de validação, bem como a faixas de aceitação e os procedimentos a serem adotados encontram-se descritos em diversos guias de validação disponíveis na literatura, como por exemplo, o *Guidance for Industry* do *Food and Drug Administration* (FDA, 2001) e o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil - RE nº 27, de 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2012). Por esse motivo apenas um breve resumo descrevendo cada parâmetro de validação será abordado nessa revisão.

- A) Seletividade: habilidade de um método analítico de diferenciar e quantificar os compostos em estudo de outros componentes que possam estar presentes na matriz biológica (metabólitos, medicamentos, produtos de degradação, nicotina e cafeína) (BRASIL, 2003; ICH, 2005; BRASIL, 2012). Em métodos instrumentais de separação a seletividade é a garantia de que os resultados obtidos não sejam prejudicados pela presença de interferentes da amostra;
- B) Efeito residual: O efeito residual é gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou padrão interno causado por contaminação proveniente de

---

amostras analisadas anteriormente (BRASIL, 2012). Trata-se então, de um ensaio que visa garantir que a amostra anterior não interfira na amostra seguinte em função de contaminações;

- C) Efeito matriz: O efeito matriz é o efeito na resposta do analito ou padrão interno causado pela co-eluição de componentes residuais da matriz, que afetam a eficiência da ionização ou detecção das moléculas alvo (supressão ou elevação de sinal). Avaliar esse parâmetro é de suma importância para evitar a expressão de falsos resultados (PATEL, 2011; BRASIL, 2012);
- D) Limite de detecção: O limite de detecção (LD) é denominado como sendo a menor concentração de uma dada substância que o procedimento analítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2007). Para procedimentos analíticos instrumentais que demonstram o ruído da linha de base (caso do CLAE-EM/EM), o LD é determinado através da relação sinal-ruído, comparando a medição dos sinais do composto de interesse em baixas concentrações em relação a um branco. A estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de duas a três vezes o ruído da linha de base (INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 2005; USP, 2007);
- E) Limite inferior de quantificação: O limite inferior de quantificação (LIQ) é estabelecido por meio da análise da matriz biológica contendo a menor concentração do analito quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. O LIQ pode ser determinado por meio da relação sinal/ruído de 10 vezes a altura do ruído da linha de base (BRASIL, 2012);
- F) Linearidade: A linearidade é definida como a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (FDA, 2001). A validação quanto a este parâmetro deve garantir um máximo de precisão e exatidão nos resultados, parâmetros esses monitorados através das amostras de controle de qualidade (CQ). As CQ nada mais são do que amostras de matriz adicionada do analito em concentração específica, utilizadas para validar e
-



---

monitorar o desempenho de um método bioanalítico (BRASIL, 2012). Os níveis de concentração das CQ monitoradas em ensaios bioanalíticos são:

- Amostra de controle de qualidade de baixa concentração (CQB): amostra de matriz adicionada do analito em concentração até três vezes o limite inferior de quantificação do método;
- Amostra de controle de qualidade de média concentração (CQM): amostra de matriz adicionada do analito em concentração próxima à média entre os limites inferior e superior de quantificação do método;
- Amostra de controle de qualidade de alta concentração (CQA): amostra de matriz adicionada do analito em concentração entre 75 e 85% da maior concentração da curva de calibração;
- Amostra de controle de qualidade de diluição (CQD): amostra de matriz adicionada do analito em concentração acima da maior concentração da curva de calibração, analisada por meio de procedimento e proporção de diluição especificada pelo laboratório analítico (BRASIL, 2012);

G) Precisão: A precisão representa a proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz (BRASIL, 2012). A importância desse parâmetro está em garantir que os erros aleatórios produzidos pelo novo método sejam uniformemente distribuídos em torno de certo valor;

H) Exatidão: A exatidão de um método analítico é definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico (BRASIL, 2012). Este parâmetro constitui uma das chaves para o propósito da validação, pois avalia o erro sistemático promovido em toda etapa analítica;

I) Recuperação: O parâmetro de recuperação mede a eficiência do processo de extração. Este parâmetro corresponde à percentagem do analito extraído da

---

matriz biológica fortificada em diferentes níveis de concentração, dentro de um limite de variação. Valores desejáveis de recuperação encontram-se próximos de 100%, mas admitem-se valores menores desde que a recuperação seja precisa e exata (BRASIL, 2003);

- J) Estabilidade do analito em matriz biológica e em solução: O ensaio de estabilidade deve ser realizado para assegurar que a concentração do analito a ser determinada na amostra permaneça estável durante o decorrer do estudo. A instabilidade das drogas, seus metabólitos ou ainda das pró-drogas é um dos principais problemas relativos às amostras biológicas, e por isso, monitorar o comportamento da substância de interesse tanto em solução quanto na matriz biológica é de fundamental importância para evitar a subestimação ou a superestimação da sua concentração (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Os problemas de estabilidade podem ocorrer em qualquer etapa de um procedimento analítico (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009), mas em geral se relacionam com as condições de armazenamento, presença de enzimas, pH, anticoagulante, ciclos de descongelamento, luz, e pelas propriedades químicas do analito, da matriz e do recipiente de armazenamento (FDA, 2001; BRASIL, 2003; NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Dessa forma, o ensaio de estabilidade deve reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras, e não pode ser extrapolado se houver qualquer mudança na conduta de um ensaio bioanalítico (BRASIL, 2003, 2012).

## 2.6 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO APLICADOS EM ENSAIOS BIOANALÍTICOS

### 2.6.1 Extração por precipitação de proteínas

O método de extração por precipitação de proteínas é um dos mais utilizados como pré-tratamento de amostras de soro ou plasma (FLANAGAN *et al.*, 2006; NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Esta técnica consiste na adição de solventes

orgânicos à amostra biológica, a qual é submetida à agitação e em seguida centrifugada. O sobrenadante pode então ser analisado diretamente, ou até mesmo sofrer uma segunda etapa de tratamento, dependendo do nível de proteínas remanescente na solução (FLANAGAN *et al.*, 2006).

A técnica de extração por precipitação de proteínas exige poucas etapas para ser consolidada, e por isso é considerada a mais simples, barata e rápida de ser executada. Além disso, essa técnica apresenta como benefício a possibilidade de extrair do plasma compostos com diferenças significativas de polaridades (MA *et al.*, 2008). Apesar das vantagens a eficiência deste procedimento é ainda bastante discutida na literatura (FLANAGAN *et al.*, 2006), pois o extraído (sobrenadante) contém uma grande quantidade de componentes remanescentes do plasma que podem diminuir a seletividade do método, ou ainda causar supressão do sinal no espectrômetro de massas. Outro fator importante e passível de ocorrência é a co-precipitação do analito de interesse com as proteínas do plasma, o que pode reduzir significativamente a recuperação do analito (MA *et al.*, 2008). Importante mencionar que nessa técnica é comum o uso de reagentes ácidos para aumentar a eficiência na precipitação das proteínas, e sendo assim o analito e o padrão interno devem ser estáveis em baixo pH. Outras vezes, o uso de filtros também é necessário, e, portanto uma perda na recuperação do analito é esperada (FLANAGAN *et al.*, 2006).

Apesar dessas desvantagens, a precipitação de proteínas continua sendo bastante utilizada em ensaios bioanalíticos, pois esta é sem dúvida a técnica mais simples de extração para este tipo de análise (FLANAGAN *et al.*, 2006). Sua aplicação permanece em grande parte dos laboratórios, e publicações recentes descrevem seu uso em sistemas totalmente automatizados com desejada precisão e exatidão (YANG *et al.*, 2004; SHIN *et al.*, 2008; WEN *et al.*, 2008).

### 2.6.2 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido é uma técnica muito popular no que diz respeito às etapas de preparação e pré-concentração de amostras biológicas (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). A técnica é baseada no particionamento da amostra entre

---

líquidos de duas fases imiscíveis, onde uma das fases é aquosa e a outra um solvente orgânico (WAL *et al.*, 2010). Na extração líquido-líquido os compostos mais hidrofílicos preferem a fase aquosa enquanto que os hidrofóbicos a fase orgânica. Dessa forma, os analitos extraídos pela fase orgânica são facilmente recuperados através da evaporação do solvente, enquanto que os remanescentes da fase aquosa podem ser injetados diretamente no CLAE (WAL *et al.*, 2010).

Este tipo de extração tem a vantagem de ser bastante simples, mas algumas desvantagens como a formação de emulsões podem dificultar o seu uso. Em alguns casos também é necessário utilizar uma grande quantidade de solvente orgânico (muitas vezes tóxicos), o que torna a técnica prejudicial para o meio ambiente (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Em relação aos custos da utilização da extração líquido-líquido a literatura é bastante controversa, mas a técnica é uma das mais utilizadas em ensaios bioanalíticos, dada sua rapidez e capacidade de recuperação (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009; WAL *et al.*, 2010).

### 2.6.3 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE) é uma das técnicas de extração mais desenvolvidas e populares da bioanálise, fato esse atribuído à sua grande seletividade e efetividade na recuperação de analitos a partir de matrizes complexas (BLAHOVÁ; BRANDSTETEROVÁ, 2004; WAL *et al.*, 2010).

Na SPE o analito de interesse é particionado entre uma fase líquida (amostra) e uma fase estacionária, em geral adsorventes à base de sílica, fases quimicamente ligadas à sílica, polímeros e seus derivados (CIOLA, 1998; KATAOKA, 2003). Os cartuchos de fase estacionária são disponibilizados na forma de seringas (CIOLA, 1998; KATAOKA, 2003) ou pipetas contendo suporte para fase estacionária, também conhecida como pipetas de extração (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009).

Na SPE a substância de interesse é eluída por uma fase estacionária sólida, onde o analito fica retido de acordo com o grau de afinidade por essa fase. A partir de então os interferentes podem ser eluídos ou lavados, minimizando a presença de substâncias indesejadas na fração final do extrato (WAL *et al.*, 2010). Todavia, para

---

que a extração aconteça de forma efetiva, é necessário que o analito tenha uma afinidade maior pela fase estacionária do que pela matriz (KATAOKA, 2003); em outras palavras, a escolha correta do adsorvente é o ponto-chave para que a extração aconteça de forma seletiva (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009).

O uso de SPE apresenta algumas desvantagens como a necessidade de utilizar quantidade apropriada de amostra de acordo com o tipo de dispositivo. O sistema também necessita de aparato adequado e cuidados na velocidade de eluição da amostra. Além de tudo, os dispositivos aplicados em ensaios biológicos são descartáveis, o que torna a técnica onerosa (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Em contrapartida, o sistema utiliza pouco solvente orgânico comparado com extração líquido-líquido e não forma emulsões (KATAOKA, 2003; BLAHOVÁ; BRANDSTETEROVÁ, 2004).

## 2.7. CONCEITOS BÁSICOS DE FARMACOCINÉTICA

A disposição cinética de um fármaco, ou farmacocinética, é controlada pelos processos de absorção, metabolismo, distribuição nos tecidos e excreção. A farmacocinética pode ser quantificada através da abordagem por modelos matemáticos desses processos, que relacionam a dose, concentração do fármaco no fluido biológico e a resposta farmacológica (CLARKE, 1986). Com o objetivo de compreendermos um pouco mais sobre cada um desses processos, um breve resumo sobre o trajeto de um fármaco no organismo e o significado dos principais parâmetros farmacocinéticos é apresentado a seguir. O texto foi elaborado enfatizando a via de administração oral, objeto de nosso estudo.

### 2.7.1 Absorção no trato gastrointestinal

A via de administração é um fator determinante na velocidade e na extensão da absorção de um fármaco. No caso de fármacos administrados por via oral, é de

---

se esperar que a absorção seja bastante complexa, pois a passagem do fármaco pela membrana gastrointestinal depende de uma série de fatores tais como as características do meio, as características físico-químicas do fármaco, e os mecanismos de transporte (LABAUNE, 1993; TOZER; ROWLAND, 2009).

No trato gastrointestinal (TGI), o tecido hepático, a vesícula biliar e o pâncreas emitem secreções para a luz intestinal que são fundamentais para o processo de digestão e absorção de nutrientes, assim como para os fármacos. Cerca de 8 litros de secreções são emitidos pelo TGI diariamente, porém somente cerca de 150 mL são eliminados por esta via em decorrência da eficiente reabsorção de água que ocorre no intestino grosso. A secreção gástrica apresenta pH de 1 a 5, dependendo da presença ou ausência de alimentos (GUYTON & HALL, 2002).

A secreção do pâncreas possui bicarbonato, que neutraliza o pH do suco gástrico e protege o epitélio intestinal, além de propiciar o pH necessário para a ação das enzimas pancreáticas e prevenir a precipitação dos ácidos biliares. O pH na região do intestino delgado pode variar consideravelmente à medida que ocorre o distanciamento da região estomacal (5,7 a 7,7,). Na porção distal do intestino grosso, estima-se o pH em torno de oito. Esses fatores são importantíssimos na absorção dos fármacos, uma vez que o pH do meio determina sua solubilização e a quantidade disponível para ser absorvida (GUYTON & HALL, 2002). A priori, o estômago é pouco adaptado para assegurar uma boa absorção dos fármacos, pois sua vascularização é pobre e o meio é bastante ácido. Em contrapartida o intestino delgado constitui uma superfície de absorção de ordem de 300 m<sup>2</sup> sendo a mucosa intestinal caracterizada pela existência de vilosidades fortemente vascularizadas, o que favorece a absorção de fármacos e nutrientes (LABAUNE, 1993).

Os sais biliares também estão diretamente relacionados com a absorção dos fármacos, pois esses são surfactantes que aumentam a dissolução de moléculas pouco solúveis. Assim, caso haja uma refeição rica em gorduras, haverá estímulo à secreção de sais biliares e, por consequência, o aumento da absorção destes compostos. Por outro lado os sais biliares podem diminuir a absorção de fármacos se os tornarem compostos insolúveis em água, como o que ocorre com a neomicina e canamicina (GUYTON & HALL, 2002). Outro fator importante no processo de absorção de um fármaco é a característica físico-química, pois um ativo só pode ser absorvido se atender aos requisitos de acidez ou basicidade, pKa (forma iônica ou

---

não iônica dependendo do pH), coeficiente de partição (reflexo da lipossolubilidade) e massa molar (quanto maior a massa molar mais lenta é a absorção) (LABAUNE, 1993).

O tipo de transporte celular também é um fator determinante na velocidade e extensão da absorção de um fármaco, sendo o mecanismo mais comum o por difusão passiva. O transporte por difusão passiva ocorre no sentido do gradiente de concentração e não necessita de fonte de energia, pois depende exclusivamente da hidrossolubilidade, lipossolubilidade e da proporção da forma ionizada ou molecular do fármaco (LABAUNE, 1993).

Um segundo mecanismo de transporte muito utilizado pelas células é o por difusão facilitada, o qual requer um transportador onde a substância se liga temporariamente facilitando sua passagem pela membrana celular. A velocidade de transporte é superior ao da difusão passiva e não é proporcional ao gradiente de concentração. Esse tipo de transporte requer reserva energética apenas para a manutenção da organização celular (LABAUNE, 1993).

Um terceiro mecanismo utilizado para transportar o fármaco do intestino para o sistema circulatório é o transporte ativo, o qual ocorre na membrana celular contra gradiente de concentração. Esse tipo de transporte é específico para uma dada substância e há a necessidade de energia fornecida pela adenosina trifosfato (ATP). Nesse caso quando dois compostos são transportados pelo mesmo elemento pode se desenvolver um fenômeno de inibição competitiva (LABAUNE, 1993).

A velocidade e a extensão da absorção de um fármaco podem também ser influenciadas por alguns moduladores da absorção como, por exemplo, o esvaziamento gástrico, o qual está sob a dependência de hormônios, do sistema nervoso central, do volume, da composição, da viscosidade, do pH, da temperatura, do conteúdo estomacal, da ingestão de alimentos e da prática de exercícios físicos. A dor, a emoção, a posição corporal ou a ingestão de alguns medicamentos também podem influenciar diretamente a velocidade de chegada do fármaco ao sistema circulatório (LABAUNE, 1993).

A dissolução também é um importante modulador do processo de absorção, pois uma substância só pode ser absorvida se estiver dissolvida. Fármacos veiculados através de formas farmacêuticas líquidas, como por exemplo, o xarope, são mais rapidamente absorvidos do que aqueles sob a forma farmacêutica sólida

---

(comprimidos, por exemplo). A absorção é também superior quando o tamanho de partícula é reduzido, ou o fármaco se encontra na forma de sais, o que facilita sua dissolução. O débito sanguíneo intestinal também influencia diretamente a absorção dos fármacos, pois a maioria dessas substâncias é absorvida no intestino delgado onde o fluxo sanguíneo é intenso. Assim, se o débito sanguíneo intestinal decresce, há também uma redução na absorção das substâncias muito permeáveis. Modificações do gradiente de concentração entre a luz intestinal e a serosa também podem ocorrer em casos onde existam modificações no débito sanguíneo intestinal (LABAUNE, 1993).

### 2.7.2 Efeito de primeira passagem

O efeito de primeira passagem consiste na perda de um ativo pela ação das enzimas de um determinado órgão. O composto resultante dessa perda se encontra transformado em produto(s) de biotransformação denominado(s) de metabólito(s) (LABAUNE, 1993).

Há casos em que as reações enzimáticas ocorrem na mucosa intestinal, porém o risco de biotransformação de um fármaco é maximizado quando este atinge o fígado. O fármaco que permanece intacto após a passagem pelo intestino e pelo fígado será liberado nas veias subepáticas em direção aos pulmões, onde também pode ser metabolizado pelas enzimas pulmonares. Tanto no tecido hepático, como intestinal e pulmonar, o efeito da primeira passagem tem por consequência a perda parcial do produto inicial, e em decorrência disso, a perda parcial do seu efeito (LABAUNE, 1993).

A fração do fármaco absorvido e que não foi biotransformada pelo metabolismo intestinal, hepático e pulmonar é liberada na circulação geral e torna-se biodisponível para alcançar os sítios de ação. A partir de então o fármaco ou seus metabólitos podem ser eliminados (por exemplo, pela urina) ou excretados pelo fígado via bile, retornando para o lúmen do trato gastrointestinal e sendo reabsorvidas (circulação entero-hepática). A circulação entero-hepática pode levar o

---



fármaco a um novo metabolismo ou ainda promover toxicidade devido ao prolongamento de sua persistência no organismo (CLARKE, 1986).

### 2.7.3 Biodisponibilidade

A biodisponibilidade é definida como a velocidade e extensão pela qual a substância ativa é absorvida da forma farmacêutica e torna-se disponível no sítio de ação (FDA, 2001; BRASIL, 2002). Considerando que a quantidade do fármaco contida no fluido biológico está em equilíbrio com o sítio de ação, a biodisponibilidade é determinada através da medida da concentração do ativo em um fluido biológico em função do tempo (BRASIL, 2002). Os fluídos mais comumente amostrados são o plasma e a urina, sendo o primeiro o de maior preferência por refletir na íntegra o perfil sistêmico temporal de um fármaco (TOZER; ROWLAND, 2009).

A biodisponibilidade é avaliada através de uma curva que relaciona o tempo e a concentração plasmática de um fármaco (Figura 4). O perfil da curva vai depender da via de administração, que se for oral (objeto de nosso estudo), deve apresentar um aumento da concentração inicial do fármaco no início da curva (fase de absorção), e uma redução quando a eliminação for o processo principal (CLARKE, 1986). Do ponto de vista prático, a relevância de um estudo de biodisponibilidade é a correlação da dose administrada com a concentração plasmática e a duração e a intensidade do efeito biológico de um ativo (CLARKE, 1986). Os principais parâmetros farmacocinéticos calculados em um estudo de biodisponibilidade são:

- A área sob a curva (ASC): Utilizada para medir a extensão da absorção, ou o montante total do fármaco absorvido pelo organismo após a administração da dose única de um medicamento. É calculada pelo método dos trapezoides e pode ser representada pela área sob a curva do tempo zero até o tempo da última coleta ( $ASC_{0-t}$ ), ou área sob a curva de concentração plasmática extrapolada ao infinito ( $ASC_{0-\infty}$ );

- Concentração máxima ( $C_{\max}$ ): Medida que representa a maior concentração do fármaco observada no fluido biológico. É diretamente proporcional ao montante total do fármaco absorvido pelo organismo;
- Tempo de ocorrência da concentração máxima ( $T_{\max}$ ): Tempo de coleta no qual foi observada a ocorrência do  $C_{\max}$ . Está relacionado com a velocidade de absorção do fármaco (BRASIL, 2002, 2006b).

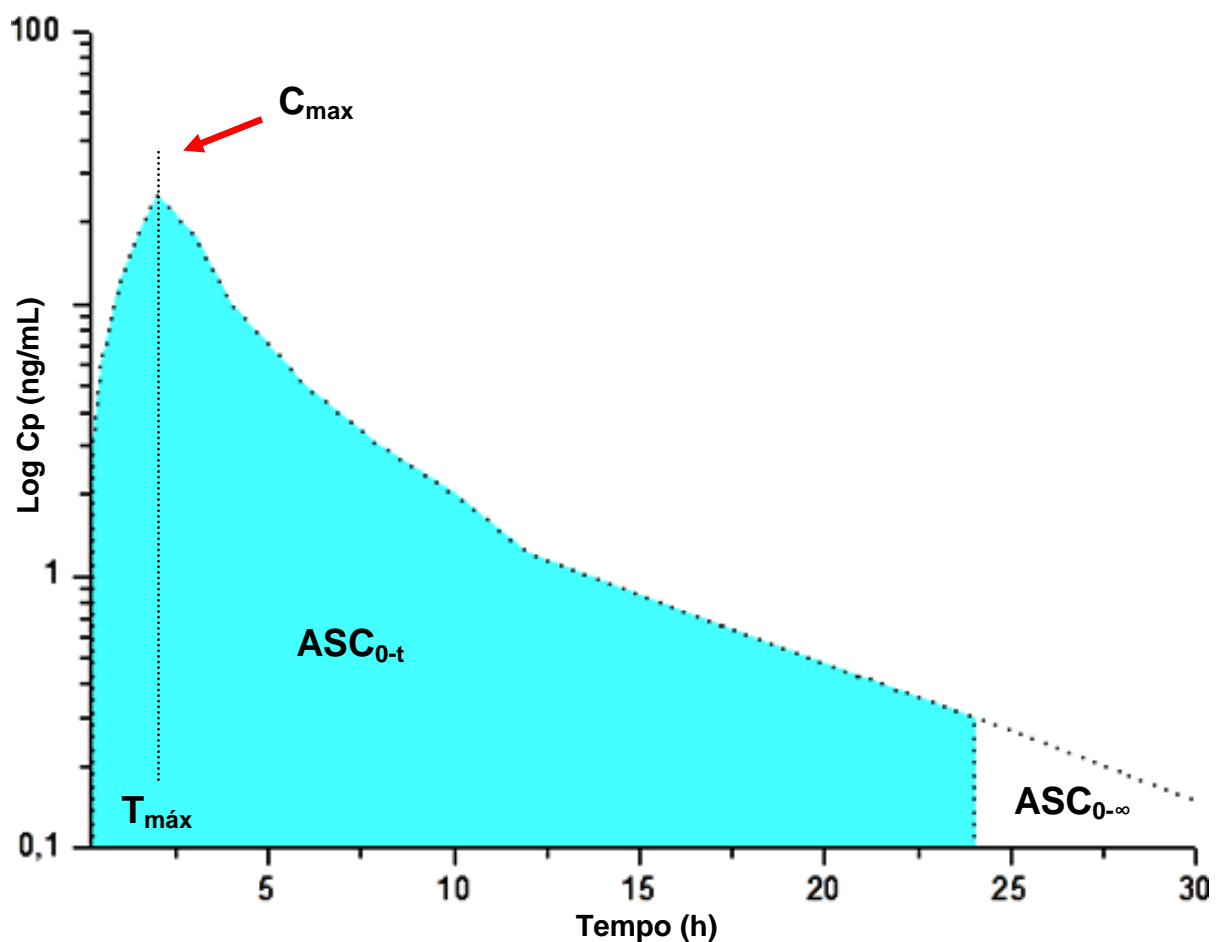


FIGURA 04: EXEMPLO DE UMA CURVA TEMPORAL DE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE UM FÁRMACO ADMINISTRADO VIA ORAL EM DOSE ÚNICA, MOSTRANDO A CONCENTRAÇÃO SISTÊMICA MÁXIMA ( $C_{\max}$ ), O TEMPO DO PICO DE CONCENTRAÇÃO MÁXIMA ( $T_{\max}$ ), A ÁREA SOB A CURVA DO TEMPO ZERO ATÉ O TEMPO DA ÚLTIMA COLETA ( $ASC_{0-t}$ ) E A ÁREA SOB A CURVA DE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA EXTRAPOLADA AO INFINITO ( $ASC_{0-\infty}$ ). Fonte: (TOZER; ROWLAND, 2009).

---

#### 2.7.4 Distribuição

Após atingir a circulação sistêmica o fármaco é distribuído pelo corpo (CLARKE, 1986). A fase de distribuição da maioria dos fármacos ocorre entre 0,5 e 2 h, e se torna constante no momento em que o ativo estiver totalmente distribuído nos tecidos (CLARKE, 1986).

A distribuição é realizada por meio da fixação do fármaco a algumas proteínas plasmáticas circulantes (albumina, alfa 1-glicoproteína ácida, lipoproteínas – gamaglobulinas), resultando na formação do complexo fármaco-proteína, ou ainda a existência do composto sob a forma livre e ligada (LABAUNE, 1993). Em seguida ocorre a distribuição tissular do fármaco, que depende de vários fatores como:

- Fluxo sanguíneo;
- Coeficiente de partição do fármaco (entre o sangue e o tecido);
- Tamanho da molécula;
- Grau de ionização da droga (no pH do plasma);
- Extensão do tecido;
- Competição pela fixação da droga entre as proteínas plasmáticas e os tecidos (afinidade pelas proteínas tissulares, pelos ácidos nucleicos, por gorduras, etc.) (CLARKE, 1986; LABAUNE, 1993).

A concentração plasmática de um fármaco é uma função da dose e da extensão da distribuição da droga nos tecidos (TOZER; ROWLAND, 2009). A medida direta da extensão da distribuição do fármaco é denominada de volume de distribuição ( $V_d$ ), o qual é calculado através da relação entre a quantidade de fármaco presente no organismo e a concentração plasmática desse fármaco (Equação 01) (BRASIL, 2002).

---

$$Vd = \frac{\text{Dose (quantidade de fármaco no organismo)}}{\text{Concentração plasmática do fármaco}} \quad \text{Equação (1)}$$

Os valores resultantes do cálculo do Vd raramente correspondem ao volume fisiológico real de um compartimento (Tabela 1), pois a distribuição do fármaco pode ocorrer em qualquer um ou em uma combinação de tecidos e fluidos do organismo. Além disso, a ligação aos componentes teciduais pode ser tão grande que o volume de distribuição resultante pode corresponder a muitas vezes o tamanho corporal (TOZER; ROWLAND, 2009). Em outras palavras, as taxas tissulares de um fármaco são frequentemente superiores às taxas sanguíneas, e por isso, na maioria dos casos, o valor de Vd encontrado é largamente superior ao volume fisiológico total (LABAUNE, 1993). Dessa forma, não se pode afirmar que o valor de Vd encontrado para um determinado fármaco corresponda à sua distribuição em um determinado compartimento. A única certeza que se pode ter, é que quanto maior o valor do Vd, mais elevada é a distribuição desse fármaco no organismo (LABAUNE, 1993).

**TABELA 1. VOLUME FISIOLÓGICO DOS PRINCIPAIS COMPARTIMENTOS DO ORGANISMO HUMANO, E OS VOLUMES DE DISTRIBUIÇÃO CORRESPONDENTES À DISTRIBUIÇÃO DO FÁRMACO EM CADA UM DESSES COMPARTIMENTOS**

<b>Compartimento</b>	<b>Volume fisiológico do compartimento (L)</b>	<b>Volume de distribuição correspondente (L)</b>
Plasma	2,8 a 4,2	< 10
Líquidos intersticiais	6,2 a 8,8	10 a 50
Fluído extracelular	9 a 16	10 a 50
Água intracelular	21 a 35	50 a > 5000
Água corporal total	42	50 a > 5000

Fonte: Adaptado de LABAUNE, 1993

### 2.7.5 Eliminação

O fármaco absorvido pode ser eliminado diretamente pelo sistema renal ou biliar, ou ainda ser transformado em outros metabólitos mais hidrossolúveis e de fácil eliminação (LABAUNE, 1993). As vias mais comuns de metabolismo são oxidação, redução e hidrólise (Fase I), seguidas de reações de conjugação com ácido glucurônico, sulfato, aminoácidos, glutatona e reações de acetilação e metilação (Fase II) (TOZER; ROWLAND, 2009).

A eliminação de substâncias pelo organismo é quantificada por um parâmetro farmacocinético denominado de *clearance* (Cl), o qual é definido como a habilidade do organismo de remover um fármaco do sangue ou plasma por unidade de tempo (MUIR; GOMENI, 2004; PATEL; KIRKPATRICK, 2011). O conceito de Cl tem particular aplicação clínica, pois seu valor indica a relação entre a dose de uma determinada substância e a média da sua concentração plasmática (CLARKE, 1986). Como as vias de eliminação são independentes, o Cl calculado é o total, ou seja, a soma dos *clearances* individuais de cada órgão de eliminação (LABAUNE, 1993; MUIR; GOMENI, 2004; PATEL; KIRKPATRICK, 2011). Matematicamente o *clearance* de um determinado indivíduo é dado pelo produto do volume de distribuição (Vd) pela constante da velocidade de eliminação total do fármaco no organismo ( $K_{el}$ ) (BRASIL, 2002), conforme demonstrado na Equação 2:

$$Cl = Vd \times K_{el}^* \quad \text{Equação (2)}$$

\* $K_{el}$  pode ser calculado através da análise de regressão log-linear ou através da razão  $\text{Log}_n 2 / \text{meia vida de eliminação}$  (item 2.4.6) (DHILLON; GILL, 2006; TOZER; ROWLAND, 2009).

### 2.7.6 Meia vida de eliminação de um fármaco

A meia vida de eliminação ( $T_{1/2}$ ) é o intervalo de tempo durante o qual uma concentração  $X$  de um fármaco é reduzida pela metade (PATEL; KIRKPATRICK, 2011). Comumente, a cinética de fármacos é caracterizada pelo  $T_{1/2}$  (TOZER; ROWLAND, 2009), pois através deste parâmetro é possível estimar por quanto tempo deve ser interrompido o uso de um fármaco antes que este atinja níveis tóxicos para o organismo (DHILLON; GILL, 2006). Em outras palavras, esse é um dos parâmetros mais utilizados para calcular os intervalos entre as doses de administração de um medicamento (BRASIL, 2002). O cálculo do  $T_{1/2}$  é apresentado na Equação 3:

$$T_{1/2} = \frac{0,693}{K_{el}} \quad \text{Equação (3)}$$

### 2.7.7 Ordem cinética dos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um fármaco

A velocidade dos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) de um fármaco é caracterizada por dois conceitos básicos: cinética de ordem zero e cinética de primeira ordem (DHILLON; GILL, 2006).

Quando a velocidade do processo ADME é constante, pode-se afirmar que este segue a cinética de ordem zero. Nesse caso, a quantidade metabolizada do fármaco depende exclusivamente da saturação das enzimas de metabolização, e não da sua concentração no organismo. Fármacos que mostram este tipo de eliminação são passíveis de acumulação, e conseqüentemente, apresentam cinética não linear (DHILLON; GILL, 2006; TOZER; ROWLAND, 2009). O álcool é um exemplo de droga que apresenta perfil cinético de ordem zero (DHILLON; GILL, 2006).

Por outro lado, se a velocidade do processo ADME de um fármaco depender apenas da sua concentração no organismo, assume-se que a cinética é de primeira ordem (caso da maioria dos fármacos utilizados na prática clínica) (CLARKE, 1986; DHILLON; GILL, 2006; TOZER; ROWLAND, 2009). Na cinética de primeira ordem o fármaco é igualmente eliminado mesmo que a dose administrada aumente, ou seja, se a dose for dobrada a concentração plasmática não será. Portanto não haverá acúmulo do fármaco no organismo. Por outro lado, se a dose administrada continuar aumentando, o processo pode passar de primeira ordem para ordem zero, caso comum em situações de superdosagem (DHILLON; GILL, 2006).

#### 2.7.8 Modelos farmacocinéticos

O caminho de um fármaco pelo organismo é extremamente complexo, e a ocorrência simultânea dos diversos processos na ADME pode alterar significativamente sua concentração nos tecidos e nos fluidos. A simplificação dos processos de ADME se faz então necessária para que a previsão do comportamento de um fármaco no organismo se torne uma realidade praticável (DIPIRO *et al.*, 2010).

Uma forma de simplificar os processos de ADME é aplicar alguns princípios matemáticos a modelos cinéticos apropriados, mais especificamente os modelos compartimental e não compartimental (MUIR; GOMENI, 2004; DIPIRO *et al.*, 2010).

A análise não compartimental (NCA) descreve os parâmetros farmacocinéticos através da avaliação da reta terminal – ou fase de eliminação – da curva de concentração plasmática *versus* tempo em conjunto com a área sob a curva. Os métodos que utilizam esse modelo fornecem dados reduzidos em uma ampla variedade de configurações com um número mínimo de suposições. Apesar disso, a NCA permite estimar a maioria dos parâmetros básicos da farmacocinética, caracterizando os processos de absorção, distribuição e eliminação de um fármaco no regime de dose única ou múltipla. Os métodos que utilizam modelo não compartimental permitem a análise farmacocinética independente de um modelo e fornecem uma descrição empírica entre a dose administrada e a concentração do

fármaco determinada em um fluido biológico. A análise a partir de um modelo não compartimental resume o perfil temporal da concentração plasmática de um fármaco em  $C_{max}$ , ASC e outros parâmetros farmacocinéticos utilizados. Esse método além de tudo é relativamente simples e informativo, e por isso é um dos mais utilizados para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos (MUIR; GOMENI, 2004).

Já o modelo compartimental descreve o organismo em compartimentos onde o fármaco é distribuído. Esse modelo pode descrever o organismo em um, dois ou mais compartimentos havendo ainda uma relação de equilíbrio do fármaco entre esses compartimentos. O número de compartimentos depende essencialmente do comportamento do fármaco após sua administração e da construção da curva de concentração plasmática *versus* tempo (DIPIRO *et al.*, 2010).

Os compartimentos nada mais são do que estruturas hipotéticas utilizadas para descrever o destino de um fármaco num sistema biológico na sequência da sua administração (DHILLON; GILL, 2006). Assim, os compartimentos não representam um determinado tecido ou fluido mas podem representar um grupo de tecidos ou fluidos semelhantes. A relevância do modelo compartimental é determinada pela capacidade de prever as concentrações de um fármaco nos tecidos ou fluidos em função do tempo (DIPIRO *et al.*, 2010).

O modelo de compartimento único descreve o organismo como uma unidade cineticamente homogênea (Figura 5A), pressupondo que o fármaco administrado seja rapidamente e homogeneamente distribuído (TOZER; ROWLAND, 2009; DIPIRO *et al.*, 2010). O modelo monocompartimental é caracterizado pela ocorrência de somente uma velocidade de decaimento das concentrações plasmáticas.

No modelo bicompartimental o organismo é dividido em dois compartimentos: central e periférico (Figura 5B). Esses compartimentos não têm significado fisiológico ou anatômico, mas assume-se que o compartimento central compreende os tecidos que são altamente perfundidos (coração, pulmões, rins, fígado e cérebro), e o compartimento periférico os tecidos menos perfundidos (músculo, gordura e pele). Um modelo de dois compartimentos assume que, após a administração, o fármaco atinge rapidamente o compartimento central e somente depois é distribuído para outros locais do organismo (compartimento periférico) com uma velocidade inferior. O modelo bicompartimental é caracterizado pela ocorrência de duas velocidades de decaimento da concentração plasmática.

---



No modelo de múltiplos compartimentos, a droga é distribuída em vários compartimentos. A curva logarítima temporal de concentração plasmática da droga assumirá uma resposta com mais de um exponencial, sendo que cada exponencial descreve um compartimento do corpo. O uso desse tipo de modelo não é muito comum, mas há casos de fármacos como a gentamicina que quando administrada via endovenosa apresentam esse tipo de perfil (DHILLON; GILL, 2006).

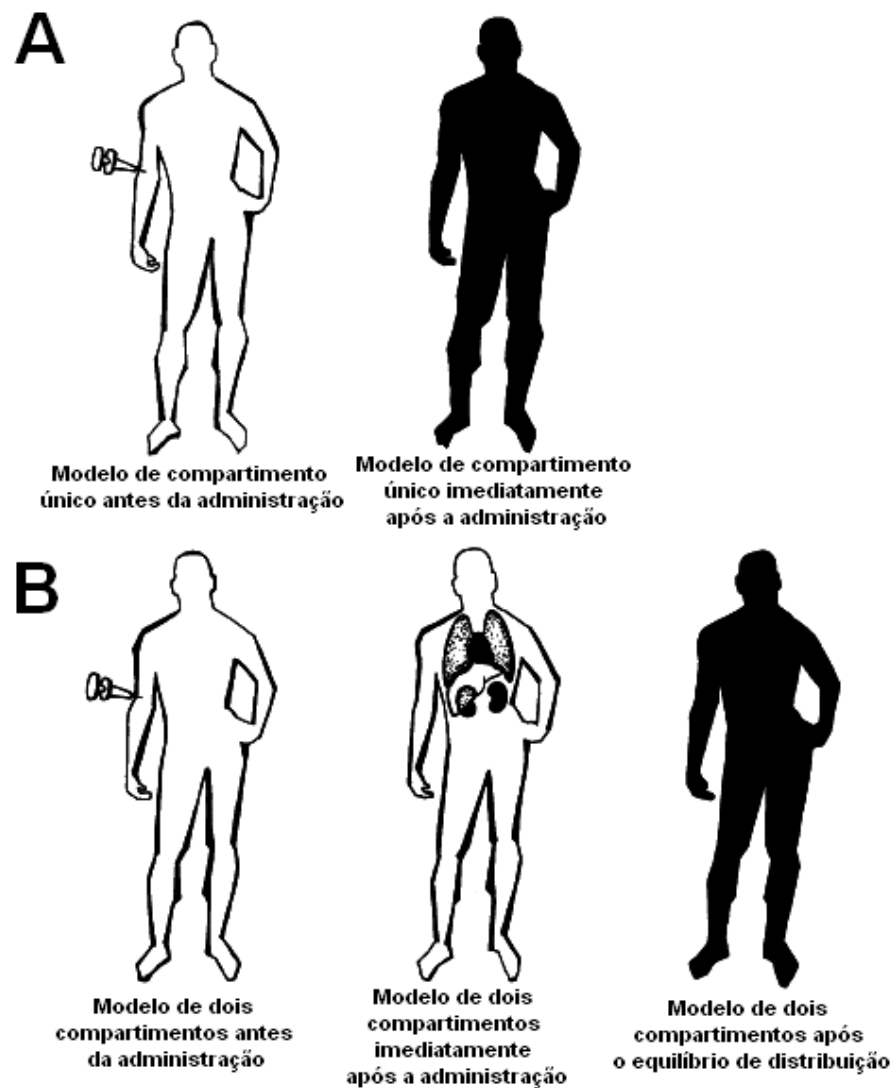


FIGURA 5. DISTRIBUIÇÃO DE UM FÁRMACO NOS MODELOS DE UM E DOIS COMPARTIMENTOS. Fonte: (DIPIRO *et al.*, 2010)

---

### ***3. MATERIAL E MÉTODOS***

---

---

### 3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA, PADRÕES ANALÍTICOS, PADRÕES INTERNOS, ESPECIALIDADE FARMACÊUTICA E REAGENTES

As amostras de plasma hemolisado (plasma contendo hemácias lisadas), plasma lipêmico (plasma pós prandial com alto teor de lipídios) e plasma normal (plasma não lipêmico e não hemolisado) utilizadas durante o desenvolvimento e a validação dos métodos foram gentilmente cedidos pela Hemepar-PR (Curitiba, Brasil). A especialidade farmacêutica xarope de guaco foi obtida no comércio local (Curitiba-PR, Brasil).

O ácido fórmico (88%) foi obtido da J. T. Baker Chemicals B.V. (Deventer, Holanda) enquanto que o metanol e a acetonitrila (ambos grau CLAE) foram adquiridos da Tedia (Fairfield, EUA). A água ultrapura foi obtida através do Sistema de Purificação Milli-Q<sup>®</sup> da Millipore (Bedford, EUA).

O formiato de amônio (99%) foi obtido da Acros Organics (Nova Jersey, EUA) e o *tert*-butil metil éter (99,8%) e os padrões analíticos de cumarina (99,0%), 7-hidroxycumarina (99,8%), ácido *o*-cumárico (97,0%), 6-metilcumarina (99,0%), ácido isoferúlico (98,0%) e prednisona (99,0%) foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). O ácido caurenóico foi isolado da espécie *M. lanuginosa* DC. Este metabólito foi purificado, devidamente identificado (IV, CG/EM, <sup>1</sup>H, e <sup>13</sup>C RMN) e gentilmente cedido pelo Professor Dr. Obdúlio Gomes Miguel do laboratório de fitoquímica da Universidade Federal do Paraná (Curitiba, Brasil). As estruturas químicas dos compostos utilizados nesse estudo são apresentadas na Figura 6.

---

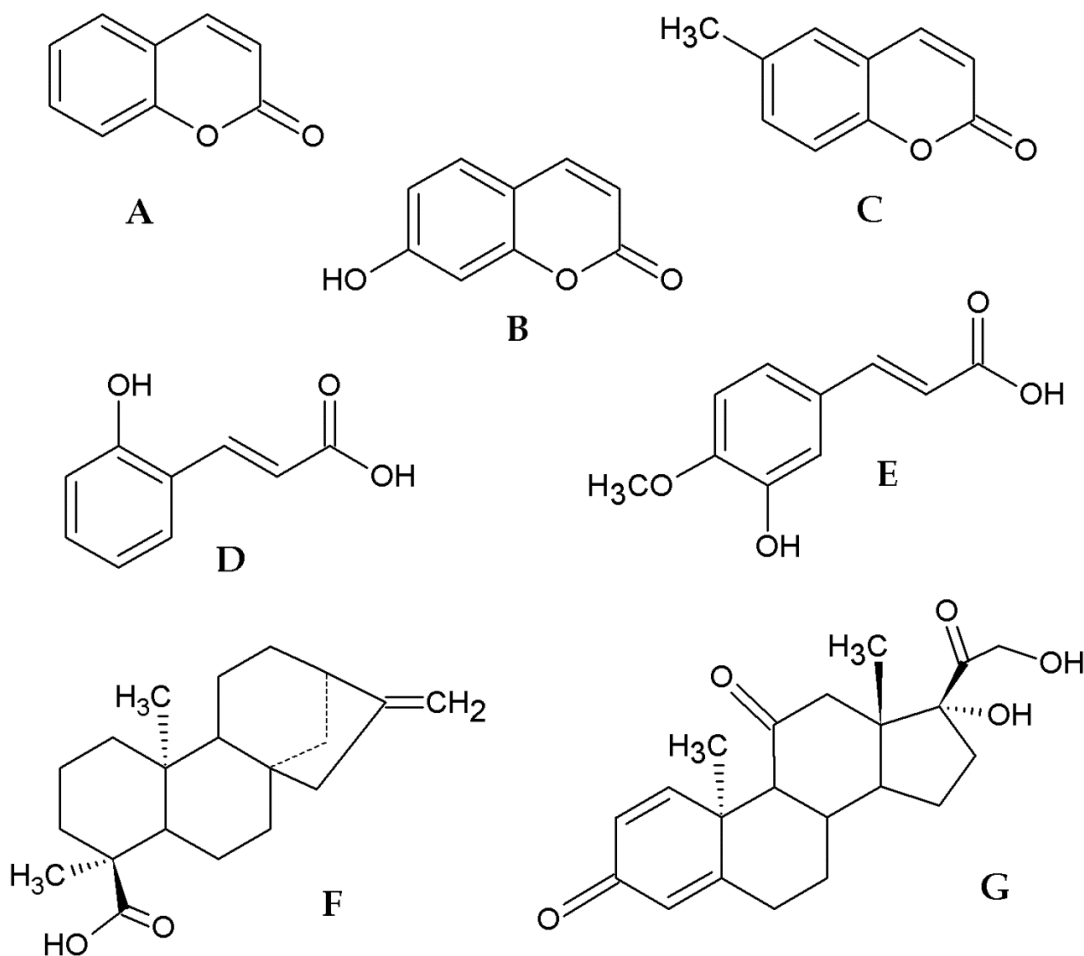


FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA DA (A) CUMARINA, (B) 7-HIDROXICUMARINA, (C) 6-METILCUMARINA, (D) ÁCIDO O-CUMÁRICO, (E) ÁCIDO ISOFERULICO, (F) ÁCIDO CAURENÓICO E (G) PREDNISONA

### 3.2 COMPOSIÇÃO DA ESPECIALIDADE FARMACÊUTICA ADMINISTRADA NOS VOLUNTÁRIOS

A escolha da marca do xarope de guaco administrado nos voluntários foi baseada nos teores de cumarina, ácido o-cumárico e ácido caurenóico (metabólitos do guaco de maior relevância terapêutica) presentes na especialidade farmacêutica. Diferentes marcas de xarope disponíveis no comércio brasileiro foram analisadas, sendo escolhida a especialidade que continha a maior quantidade dessas substâncias por mililitro de xarope. Os teores de cumarina, ácido o-cumárico e ácido caurenóico foram determinados através de um método por CLAE-EM/EM desenvolvido e validado em nosso laboratório (GASPARETTO *et al.*, 2011a). A

composição do xarope escolhido, bem como os teores de cumarina, ácido o-cumárico e ácido caurenóico determinados nessa amostra encontram-se disponibilizados no Quadro 2:

**QUADRO 2. COMPOSIÇÃO DO XAROPE DE GUACO E TEOR DE CUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO E ÁCIDO CAURENOICO DETERMINADOS NA ESPECIALIDADE**

<b>Cada mL do xarope de guaco contém:</b>	
Extrato concentrado de <i>Mikania glomerata</i> Sprengel.....	81,5 mg
Veículos (Água deionizada, sorbitol 70%, propilenoglicol, carboximetilcelulose sódica, sacarina, aroma de eucalipto, metilparabeno, edetato dissódico e propilparabeno) .....	q.s.p. 1 mL
Teor dos principais metabólitos do guaco determinado no xarope.....	0,2935 mg de cumarina, 0,0184 mg de ácido o-cumárico e 0,1482 mg de ácido caurenóico

### 3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES

As soluções estoque de cumarina, 7-hidroxicumarina, ácido o-cumárico, ácido caurenóico e dos padrões internos 6-metilcumarina, ácido isoferúlico e prednisona foram preparadas, separadamente, em metanol de modo a obter uma concentração final de 1 mg/mL. As soluções de trabalho foram preparadas a partir das soluções estoque através de diluição apropriada em acetonitrila/água (70:30 v/v), de acordo com a necessidade de cada experimento. As soluções estoque e de trabalho foram mantidas sob-refrigeração a 4 °C em frasco de vidro âmbar.

### 3.4 INSTRUMENTAÇÃO

As análises foram realizadas em um Cromatógrafo a Líquido Agilent 1200 (Wilmington, EUA) composto de bomba binária G1312B, desgaseificador G1379B, e forno de coluna G1316B. O sistema foi conectado a um gerenciador de amostras CTC 2777 (Waters Corporation, Milford, EUA), que durante as análises foi mantido a temperatura ambiente. Acetonitrila e metanol foram utilizados separadamente como solvente de limpeza no gerenciador de amostras.

O CLAE foi acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Triplo Quadrupolo (API 3200, Applied Biosystems, Toronto, Canadá), equipado com bomba de seringa Havard 22 Dual Model (Harvard Apparatus, South Natick, EUA) e fonte de ionização por *electrospray* (ESI). Para o monitoramento em plasma da cumarina, 7-hidroxycumarina e 6-metilcumarina (PI) os seguintes parâmetros foram ajustados:

- Fase móvel: mistura de acetonitrila/água/ácido fórmico (65:35:0,05 v/v/v) eluída em modo isocrático a 200 µL/min;
- Coluna: XBridge Shield RP18 150 x 2.1 mm, 5 µm de tamanho de partícula acoplada a uma pré-coluna XBridge RP18 10 x 2.1 mm, 5 µm de tamanho de partícula (Waters Corporation, Mildford, EUA);
- Temperatura de forno da coluna: 25 °C;
- Volume de injeção: 20 µL;
- Fonte de ionização: ESI / modo positivo de ionização;
- Parâmetros da fonte de ionização: voltagem do capilar (IS): 5500 V, temperatura: 450 °C, gás de interface (CUR): 10 psi, gás de colisão (CAD): 6 psi, gás de nebulização (GS1): 40 psi e gás auxiliar (GS2): 40 psi;
- Aquisição dos dados: Monitoramento de reações múltiplas (MRM) com *dwel time* de 300 ms;
- Parâmetros individuais e transições monitoradas de cada composto: De acordo com o descrito na Tabela 2.

TABELA 2 – ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA A DETERMINAÇÃO EM PLASMA DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E 6-METILCUMARINA

Composto	Íon molecular (m/z)*	Transições (m/z)	CE <sup>a</sup> (eV)	CEP <sup>b</sup> (V)	CXP <sup>c</sup> (V)	DP <sup>d</sup> (V)	EP <sup>e</sup> (V)
Cumarina	147,3	147,3 → 91,0**	31	12	4	36	8
		147,3 → 103,1	25	8,4	4	36	8
7-hidroxicumarina	163,1	163,1 → 107,1**	33	10,8	4	46	4
		163,1 → 77,0	43	11,5	4	46	10
6-metilcumarina (PI)	161,0	161,0 → 105,2**	27	10	4	61	11,5
		161,0 → 77,1	45	10	4	61	11,5

<sup>a</sup>CE, energia de colisão; <sup>b</sup>CEP, potencial de entrada na cela de colisão; <sup>c</sup>CXP, potencial de saída da cela de colisão; <sup>d</sup>DP, potencial de desagrupamento; <sup>e</sup>EP, potencial de entrada; \*[M+H]<sup>+</sup>; \*\*transições utilizadas para quantificação; PI: padrão interno.

Para o monitoramento em plasma dos ácidos o-cumárico, caurenóico, isoferúlico (PI) e prednisona (PI) os seguintes parâmetros foram otimizados:

- Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila/água 95:5 v/v, ambos contendo 1 mM de formiato de amônio, eluída em modo gradiente a 400 µL/min conforme segue: Tempo 0–1,0min: A=70%; Tempo 1,0–1,1min: A=5%; Tempo 1,1–5,0min: A=5%; Tempo 5,0–5,1min: A=70%; Tempo 5,1–9,0min: A=70%.
- Coluna: XBridge Shield RP18 150 x 2.1 mm, 5 µm de tamanho de partícula acoplada a uma pré-coluna XBridge RP18 10 x 2.1 mm, 5 µm de tamanho de partícula (Waters Corporation, Mildford, EUA);
- Temperatura de forno da coluna: 35 °C;
- Volume de injeção: 20 µL;
- Fonte de ionização: ESI / modo negativo de ionização;
- Parâmetros da fonte de ionização: voltagem do capilar (IS): -4500 V, temperatura: 550 °C, gás de interface (CUR): 18 psi, gás de colisão (CAD): 6 psi, gás de nebulização (GS1): 50 psi e gás auxiliar (GS2): 50 psi;
- Aquisição dos dados: MRM com  *dwell time*  de 400 ms;
- Parâmetros individuais e transições monitoradas de cada composto: De acordo com o descrito na Tabela 3.

TABELA 3 – ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA A DETERMINAÇÃO EM PLASMA DO ÁCIDO O-CUMÁRICO, ÁCIDO CAURENÓICO, ÁCIDO ISOFERÚLICO E PREDNISONA

Composto	Íon molecular ( <i>m/z</i> )*	Transições ( <i>m/z</i> )	CE <sup>a</sup> (eV)	CEP <sup>c</sup> (V)	CXP <sup>b</sup> (V)	DP <sup>d</sup> (V)	EP <sup>e</sup> (V)
Ácido o-cumárico	162,9	162,9 → 119,0**	-18	-10	0.0	-25	-5
		162,9 → 93,1	-30	-10	0.0	-25	-5
Ácido caurenóico	301,0	301,0*	-10	-22	-4	-70	-5
Ácido isoferúlico (PI)	192,8	192,8 → 134,2**	-20	-10	-4	-25	-6,5
		192,8 → 133,5	-34	-10	-4	-25	-6,5
Prednisona (PI)	357,0	357,0 → 327,0**	-15	-18	-4	-25	-6,5
		357,0 → 299,0	-15	-18	-4	-25	-6,5

<sup>a</sup>CE, energia de colisão; <sup>b</sup>CEP, potencial de entrada na cela de colisão; <sup>c</sup>CXP, potencial de saída da cela de colisão; <sup>d</sup>DP, potencial de desagrupamento; <sup>e</sup>EP, potencial de entrada; \*[M-H]<sup>-</sup>; \*\*transições utilizadas para quantificação; PI: padrão interno.

O nitrogênio de alta pureza utilizado como CUR, GS1 e GS2 foi produzido por um gerador de nitrogênio da Peak Scientific Instruments (Chicago, EUA). Os dados adquiridos pelo espectrômetro de massas foram processados através do software Analyst 1.4 (ABI/Sciex).

### 3.5 TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR A MELHOR FORMA DE EXTRAIR DO PLASMA OS ANALITOS E OS PADRÕES INTERNOS

Com o intuito de avaliar qual a melhor forma de extrair do plasma os analitos e os padrões internos, diferentes métodos de extração foram testados, incluindo extração líquido-líquido, extração em fase sólida e precipitação de proteínas.

Para condução dos ensaios, alíquotas de 200 µL de plasma branco (plasma livre dos analitos de interesse) foram transferidas para tubos de *Eppendorf*, e em seguida fortificadas com 50 µL da solução de trabalho dos analitos, e 50 µL da



solução de trabalho dos padrões internos, de modo a obter as seguintes concentrações:

- ✓ **Método utilizando ESI no modo positivo de ionização:** 250 ng/mL de cumarina, 250 ng/mL de 7-hidroxycumarina e 500 ng/mL de 6-metilcumarina (PI);
- ✓ **Modo utilizando ESI no modo negativo de ionização:** 400 ng/mL de ácido o-cumárico, 150 ng/mL de ácido caurenóico, 500 ng/mL de prednisona (PI) e 1000 ng/mL de ácido isoferúlico (PI).

Após a fortificação, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 2 min, e os analitos foram extraídos através dos seguintes procedimentos:

- *Precipitação de proteínas com acetonitrila:* Uma alíquota de 1,2 mL de acetonitrila foi adicionada ao tubo de *Eppendorf* contendo a amostra de plasma fortificada. A amostra foi agitada em vórtex por 2 min e em seguida submetida à centrifugação por 10 min (14000 rpm, -5 °C, *Eppendorf* 5810R, Hamburg, Alemanha). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de *Eppendorf*, e em seguida evaporado em um concentrador de amostras (40 °C, CentriVap Labconco, Kansas City, EUA). O resíduo remanescente foi ressuspensionado com 200 µL de acetonitrila/água (70:30 v/v) mediante agitação em vórtex por 3 min.
  - *Extração em fase sólida:* A amostra de plasma fortificada foi transferida para um cartucho de extração Oasis HLB (Waters Corporation, Mildford, EUA) previamente condicionado com 2 mL de metanol e 3 mL de água ultrapura. A amostra foi eluída pelo cartucho, e a fase estacionária lavada com 2 mL de água ultrapura. A recuperação dos analitos foi realizada com 1 mL de acetonitrila. O solvente extrator foi evaporado em um concentrador de amostras (40 °C), e o resíduo remanescente foi ressuspensionado com 200 µL de acetonitrila/água (70:30 v/v), mediante agitação em vórtex por 3 min.
-

- *Extração líquido-líquido*: Alíquotas de 1,5 mL de diferentes solventes (*tert*-butil metil éter, clorofórmio, acetato de etila e éter/hexano 70:30 v/v) foram adicionadas aos tubos de *Eppendorf* contendo as amostras de plasma fortificadas. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 2 min, e em seguida centrifugadas (10 min, 14000 rpm, -5 °C). Uma alíquota de 1,2 mL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo de *Eppendorf*, e imediatamente evaporada em um concentrador de amostras (40 °C). O resíduo remanescente foi ressuspendido com 200 µL de acetonitrila/água (70:30 v/v) mediante agitação em vórtex por 3 min.

Os ensaios foram conduzidos em sextuplicata, sendo definido o melhor procedimento de extração aquele que apresentou a maior recuperação dos analitos com desejada reprodutibilidade.

### 3.6 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO UTILIZADOS NO PREPARO DAS AMOSTRAS

Devido às diferenças nas características químicas de cada composto, dois procedimentos de extração foram utilizados no preparo das amostras:

#### 3.6.1 Extração da cumarina, 7-hidroxicumarina e 6-metilcumarina (líquido-líquido com *tert*-butil metil éter)

Uma alíquota de 1,5 mL de *tert*-butil metil éter (TBME) foi adicionada aos tubos de *Eppendorf* contendo as amostras de plasma. As amostras foram agitadas em vórtex (2 min), e então centrifugadas por 10 min (14.000 rpm, -5 °C). Uma alíquota de 1,2 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo de *Eppendorf* e o TBME foi evaporado em um concentrador de amostras (40 °C). O resíduo remanescente foi ressuspendido com 200 µL de acetonitrila/água (70:30 v/v) mediante agitação em vórtex por 3 min.

---

### 3.6.2 Extração dos ácidos o-cumárico e caurenóico (precipitação de proteínas com acetonitrila)

Uma alíquota de 1,5 mL de acetonitrila foi adicionada aos tubos de *Eppendorf* contendo as amostras de plasma. As amostras foram agitadas em vórtex (2 min) e centrifugadas por 10 min (14.000 rpm, -5 °C). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de *Eppendorf* e em seguida evaporado em um concentrador de amostras (40 °C). O resíduo remanescente foi ressuspensionado com 200 µL de acetonitrila/água (70:30 v/v) mediante agitação em vórtex por 3 min.

## 3.7 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Os métodos por CLAE-EM/EM foram validados de acordo com os critérios estabelecidos no Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil - RE nº 27, de 17 de maio de 2012. De acordo com esse guia, os seguintes requisitos devem ser atendidos para que um método bioanalítico seja considerado adequado para sua finalidade: seletividade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão, exatidão, efeito residual, efeito matriz, recuperação e estabilidade dos analitos em matriz biológica e em solução (BRASIL, 2003, 2012).

### 3.7.1 Limite de detecção e limite inferior de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite inferior de quantificação (LIQ) foram estimados através da relação sinal-ruído. Para condução desse estudo, amostras de plasma foram fortificadas com soluções dos analitos de modo a obter 100 ng/mL de cada composto. As amostras foram diluídas sucessivamente em plasma até que o menor sinal (pico cromatográfico) de cada composto fosse detectado. O LD foi estimado através da relação sinal/ruído de 3:1 enquanto que o LIQ foi estimado pela

---

relação sinal:ruído de pelo menos 10:1, até que desejada precisão fosse alcançada ( $CV < 20\%$ ).

### 3.7.2 Seletividade

A seletividade foi avaliada através do método da comparação da matriz. Para realização deste ensaio, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrila/água (70:30 v/v) foram adicionadas a tubos de *Eppendorf* contendo, separadamente, uma amostra de 200  $\mu\text{L}$  de plasma hemolisado, uma amostra de 200  $\mu\text{L}$  de plasma lipêmico e quatro amostras de 200  $\mu\text{L}$  de plasma normal (todas obtidas de fontes distintas). As amostras foram agitadas em vórtex por 2 min e os analitos foram extraídos com TBME ou acetonitrila, conforme descrito na Seção 3.6.

Em uma segunda etapa, alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de plasma normal foram fortificadas com 50  $\mu\text{L}$  da solução dos analitos e 50  $\mu\text{L}$  da solução dos padrões internos, de modo a obter as seguintes concentrações:

- **Método utilizando ESI no modo positivo de ionização:** 10 ng/mL de cumarina, 7,5 ng/mL de 7-hidroxycumarina e 500 ng/mL de 6-metilcumarina (PI);
- **Método utilizando ESI no modo negativo de ionização:** 5 ng/mL de ácido caurenóico, 10 ng/mL de ácido o-cumárico, 500 ng/mL de prednisona (PI) e 1000 ng/mL de ácido isoferúlico (PI).

As amostras fortificadas foram homogeneizadas em vórtex por 2 min, e em seguida os analitos foram extraídos com TBME ou acetonitrila, conforme descrito na Seção 3.6.

Os cromatogramas obtidos com as matrizes isentas dos analitos de interesse foram sobrepostos aos cromatogramas obtidos com o plasma fortificado. As respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito obtido com a matriz fortificada. As

respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5% da resposta do PI.

### 3.7.3 Linearidade

A linearidade foi determinada através do método da padronização interna. O estudo foi conduzido durante cinco dias consecutivos e as curvas analíticas foram preparadas em triplicata. A análise de duas amostras brancas (plasma livre dos analitos de interesse) e duas amostras zero (plasma branco contendo o padrão interno) foi incluída a cada dia de estudo.

Para o preparo das curvas analíticas, alíquotas de 200 µL de plasma branco foram fortificadas com 50 µL da solução dos analitos e 50 µL da solução dos padrões internos, de modo a obter nove níveis de concentração (Tabela 4). Após a fortificação das amostras os analitos foram extraídos com TBME ou acetonitrila, conforme descrito na Seção 3.6.

TABELA 4 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO E ÁCIDO CAURENÓICO

Compostos		Níveis de concentração (ng/mL)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Modo positivo de ionização	Cumarina	10	50	100	250	500	750	1000	1250	1500
	7-hidroxycumarina	7,5	12,5	25	50	100	250	500	750	1000
	6-metilcumarina*	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Modo negativo de ionização	Ácido o-cumárico	10	25	50	75	100	250	500	750	1000
	Ácido caurenóico	5	10	25	50	75	100	250	500	750
	Ácido isoferúlico*	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	Prednisona*	500	500	500	500	500	500	500	500	500

\*padrão interno

Para cada composto uma curva de calibração foi gerada a fim de confirmar a relação linear entre as áreas dos picos dos analitos/áreas dos picos dos padrões internos *versus* a concentração dos analitos/concentração dos padrões internos. As curvas de calibração foram construídas através do método dos quadrados mínimos utilizando regressão linear 1/x para ambos os métodos. O ângulo, o intercepto e o coeficiente de correlação (r) foram calculados como parâmetros da regressão. Além disso, para cada composto, em cada nível de concentração, foram calculados o coeficiente de variação (CV%) e o erro relativo (ER%) com a finalidade de monitorar os ajustes de precisão e a exatidão dos dados. Para cada nível de concentração as variações de precisão e exatidão não devem exceder 15%, exceto para o LIQ o qual não deve apresentar variações maiores do que 20%. O coeficiente de correlação (r) deve ser igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2012).

#### 3.7.4 Amostras de controle de qualidade

As amostras de controle de qualidade (CQ) do limite inferior de quantificação (CQ-LIQ), e as de baixa (CQB), média (CQM) e alta concentração (CQA) foram preparadas de maneira similar às amostras da curva de calibração (item 3.7.3), porém em oito réplicas, de acordo com as concentrações descritas na Tabela 5. O critério de aceitação das CQ é determinado pela obtenção de ao menos 66% dos controles com desvio inferior a 15% comparado ao valor nominal da curva de calibração, exceto para o LIQ o qual não deve apresentar variações maiores do que 20% (BRASIL, 2012).

A única amostra de CQ preparada de maneira distinta às amostras da curva de calibração foi a amostra de controle de qualidade de diluição (CQD). O preparo da CQD consistiu na fortificação de oito alíquotas de 200 µL de plasma branco com 50 µL da solução dos analitos, de modo a obter as concentrações de 1600,0 ng/mL de cumarina, 1100,0 ng/mL de 7-hidroxycumarina, 1100,0 ng/mL de ácido o-cumárico e 850,0 ng/mL de ácido caurenóico. As amostras fortificadas foram diluídas 1:10 v/v com plasma branco e em seguida agitadas em vórtex por 2 min. Uma alíquota de 200 µL da amostra diluída foi transferida para um tubo de *Eppendorf*, e fortificada com 50 µL de acetonitrila/água (70:30 v/v) e 50 µL da solução dos padrões internos

---

(500 ng/mL de 6-metilcumarina para o método desenvolvido modo positivo de ionização, e 500 ng/mL de prednisona e 1000 ng/mL de ácido isoferúlico para o método desenvolvido no modo negativo de ionização). As amostras foram novamente agitadas (vórtex, 2 min), processadas (item 3.6) e analisadas. Para a CQD não são admitidos erros de precisão maiores do que 15% entre as réplicas das amostras diluídas, bem como erros de exatidão superiores a 15% do valor nominal de fortificação (BRASIL, 2012).

TABELA 5 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE

Compostos		Nível de concentração das amostras de controle de qualidade	Concentração (ng/mL)
Modo positivo de ionização	Cumarina	CQ-LIQ	10,0
		CQB	50,0
		CQM	500,0
		CQA	1250,0
		CQD	160,0**
	7-hidroxycumarina	CQ-LIQ	7,5
		CQB	12,5
		CQM	100,0
		CQA	750,0
		CQD	110,0**
	6-metilcumarina*	-	500,0
Modo negativo de ionização	Ác. o-cumárico	CQ-LIQ	10,0
		CQB	25,0
		CQM	100,0
		CQA	750,0
		CQD	110,0**
	Ác. caurenóico	CQ-LIQ	5,0
		CQB	10,0
		CQM	75,0
		CQA	500,0
		CQD	85,0**
	Ác. isoferúlico*	-	1000,0
	Prednisona*	-	500,0

Dados: CQ-LIQ: controle de qualidade do limite inferior de quantificação; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de média concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração; CQD: controle de qualidade de diluição; \*Padrão interno; \*\*Valor nominal após diluição de 10 vezes.

### 3.7.5 Efeito residual

O teste de efeito residual consistiu de injeções alternadas de uma triplicata de brancos de plasma e uma triplicata de amostras de plasma fortificadas nos níveis mais altos de concentração da curva de calibração (item 3.7.3). A resposta do pico interferente no tempo de retenção do analito deve ser inferior a 20% (BRASIL, 2012) da resposta do analito nas amostras processadas do CQ-LIQ (Seção 3.7.4). A resposta do pico interferente no tempo de retenção do PI deve ser inferior a 5 % (cinco por cento) da resposta do PI (BRASIL, 2012).

### 3.7.6 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão foram avaliadas durante três dias consecutivos (intra e inter-dia) através da análise de oito réplicas de amostras controle (CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) preparadas conforme descrito na seção 3.7.4.

A precisão foi expressa em termos do coeficiente de variação (CV%) entre as áreas obtidas de cada composto, em um mesmo nível de concentração. O cálculo do coeficiente de variação é apresentado na Equação 4.

A exatidão foi estimada em cada nível de concentração através cálculo do erro relativo (ER%) obtido entre a concentração teórica e a concentração experimental de cada composto (Equação 5). Os erros de precisão e exatidão devem ser inferiores a 15%, exceto para o CQ-LIQ onde as variações não devem exceder 20% (BRASIL, 2012).

$$CV\% = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}} \quad \text{Equação (4)}$$

$$ER\% = \frac{C_{\text{exp}} - C_{\text{nom}}}{C_{\text{nom}}} \times 100, \quad \text{Equação (5)}$$



onde  $C_{\text{exp}}$  é a média da concentração obtida experimentalmente e  $C_{\text{nom}}$  é a concentração nominal ou real.

### 3.7.7 Teste de recuperação

Para realizar o teste de recuperação, primeiramente oito réplicas de amostras controle (CQB, CQM e CQA) foram preparadas de acordo com o descrito no item 3.7.4. Esse conjunto de amostras foi denominado de “lote 1”.

Em seguida, alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de plasma branco foram fortificadas com 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrila/água (70:30 v/v), agitadas em vórtex (2 min), e submetidas a extração com TBME ou acetonitrila (Seção 3.6). O extraído foi ressuspendido com 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrila/água (70:30 v/v), e em seguida fortificado com 50  $\mu\text{L}$  da solução do PI e 50  $\mu\text{L}$  da solução dos analitos, de modo a obter os mesmos níveis de concentração das amostras do lote 1 (CQB, CQM e CQA). Esse conjunto de amostras foi denominado de “lote 2”.

A recuperação foi estimada em percentagem, através da razão entre a quantidade do analito encontrada nas amostras de plasma do lote 1 (analito extraído) e a quantidade do analito encontrada nas amostras de plasma do lote 2 (analito não extraído, considerado 100%). O cálculo da recuperação é apresentado na Equação 6.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração do analito extraído}}{\text{Concentração do analito não extraído}} \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

### 3.7.8 Efeito matriz

Para avaliar o efeito matriz, quatro alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de plasma normal, duas alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de plasma lipêmico e duas alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de plasma

hemolisado (lotes distintos) foram inicialmente fortificadas com 100 µL de acetonitrila/água (70:30 v/v). Essas amostras foram agitadas em vórtex (2 min) e submetidas à extração com TBME ou acetonitrila, conforme descrito na Seção 3.6. O extraído foi ressuspenso com 100 µL de acetonitrila/água (70:30 v/v), 50 µL da solução do padrão interno e 50 µL da solução dos analitos, de modo a obter os níveis de concentração descritos na Tabela 6.

Para cada nível de concentração foi calculado o fator de matriz normalizado (FMN, Equação 7) das respostas obtidas com os analitos em plasma e em solução, preparada nos mesmos níveis de concentração. O efeito da matriz não é significativo quando a variação (CV%) dos fatores de matrizes normalizados relativos a todas as concentrações de um mesmo analito for inferior a 15% (BRASIL, 2012).

$$FMN = \frac{\frac{\text{Resposta do analito em matriz}}{\text{Resposta do PI em matriz}}}{\frac{\text{Resposta do analito em solução}}{\text{Resposta do PI em solução}}} \quad \text{Equação (7)}$$

TABELA 6 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO E ÁCIDO CAURENÓICO UTILIZADOS PARA AVALIAR O EFEITO MATRIZ

	Compostos	Nível de concentração 1 (ng/mL)	Nível de concentração 2 (ng/mL)
Modo positivo de ionização	Cumarina	50	1250
	7-hidroxycumarina	12,5	750
	6-metilcumarina*	500	500
Modo negativo de ionização	Ácido o-cumárico	25	750
	Ácido caurenóico	10	500
	Ácido isoferúlico*	1000	1000
	Prednisona*	500	500

\*padrão interno

### 3.7.9 Teste de estabilidade

#### 3.7.9.1 Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi determinada em matriz biológica sob as condições normais de trabalho do laboratório. Para a condução deste ensaio, alíquotas de 200  $\mu$ L de plasma branco foram fortificadas com 50  $\mu$ L da solução dos analitos, de modo a obter as seguintes concentrações:

- **Método utilizando ESI no modo positivo de ionização:** 50 e 1250 ng/mL de cumarina e 12,5 e 750 ng/mL de 7-hidroxycumarina;
- **Método utilizando ESI no modo negativo de ionização:** 10 e 500 ng/mL de ácido caurenóico e 25 e 750 ng/mL de ácido o-cumárico.

As amostras fortificadas foram agitadas (vórtex, 2 min) e em seguida mantidas sobre a bancada por 8 h a temperatura ambiente. Após este período, as amostras receberam alíquotas 50  $\mu$ L da solução dos padrões internos, de modo a obter, em cada nível de concentração, 500 ng/mL de 6-metilcumarina (método desenvolvido no modo positivo de ionização), ou 500 ng/mL de prednisona e 1000 ng/mL de ácido isoferúlico (método desenvolvido no modo negativo de ionização). As amostras foram novamente agitadas (vórtex, 2 min) e os analitos extraídos com TBME ou acetonitrila, conforme descrito na Seção 3.6. A solução contendo o resíduo ressuspensionado da extração foi injetada no CLAE-EM/EM.

Os resultados obtidos com as amostras armazenadas na bancada foram comparados com a média dos valores das amostras de plasma recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado através do ER% e CV%, os quais não devem exceder 15% (BRASIL, 2012). O ensaio foi conduzido utilizando oito (08) réplicas preparadas para cada nível de concentração.

### 3.7.9.2 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

A estabilidade dos analitos também foi determinada em matriz biológica após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando oito (08) alíquotas de 200 µL de plasma branco, fortificadas nos mesmos níveis de concentração da estabilidade de curta duração (item 3.7.9.1). As amostras fortificadas foram congeladas por 24 h (-40 °C) e então descongeladas a temperatura ambiente (1º ciclo). Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas (-40 °C) por mais um período de 24 h, e assim sucessivamente até completar 3 ciclos de congelamento e descongelamento.

Após o terceiro ciclo de descongelamento, as amostras foram fortificadas com 50 µL da solução dos padrões internos, de modo a obter em cada nível de concentração 500 ng/mL de 6-metilcumarina (método desenvolvido no modo positivo de ionização) ou 500 ng/mL de prednisona e 1000 ng/mL de ácido isoferúlico (método desenvolvido no modo negativo de ionização). As amostras foram agitadas em vórtex (2 min) e os analitos extraídos com TBME ou acetonitrila, conforme descrito na Seção 3.6.

Os resultados obtidos com as amostras do ciclo de congelamento e descongelamento foram comparados com a média dos valores obtidos com amostras recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado através do ER% e CV%, os quais não devem exceder 15% (BRASIL, 2012).

### 3.7.9.3 Estabilidade de longa duração

Para avaliar a estabilidade de longa duração, quatro alíquotas de 2 mL de plasma branco foram fortificadas com solução dos analitos, de modo a obter os mesmos níveis de concentração da estabilidade de curta duração (item 3.7.9.1). Após a fortificação, as amostras de plasma foram agitadas (vórtex, 2 min), e em seguida congeladas (-40 °C) por um período de 60 dias (período que excedeu o

---

tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última). Após este período, as amostras foram descongeladas, aliquotadas (200 µL), e fortificadas com 50 µL da solução dos padrões internos (500 ng/mL de 6-metilcumarina para o método desenvolvido no modo positivo de ionização ou 500 ng/mL de prednisona e 1000 ng/mL de ácido isoferúlico para o método desenvolvido no modo negativo de ionização). As amostras foram agitadas em vórtex por 2 min e os analitos extraídos com TBME ou acetonitrila, conforme descrito na Seção 3.6.

Cada nível de concentração foi avaliado utilizando oito (08) réplicas de amostras, sendo os resultados obtidos com as amostras armazenadas em freezer (60 dias) comparados com a média dos valores obtidos com amostras de plasma recém-preparadas. O comparativo foi realizado através do ER% e CV%, os quais não devem exceder 15% (BRASIL, 2012).

#### 3.7.9.4 Teste de estabilidade pós-processamento

O teste de estabilidade de pós-processamento foi avaliado em matriz biológica, utilizando oito (08) alíquotas de 200 µL de plasma branco, adicionadas de 50 µL da solução dos analitos e 50 µL da solução dos padrões internos, de modo a obter os níveis de concentração descritos na Tabela 7.

**TABELA 7 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO E ÁCIDO CAURENÓICO UTILIZADOS NO ENSAIO DE ESTABILIDADE DE PÓS-PROCESSAMENTO (n=8)**

Compostos		Nível de concentração 1 (ng/mL)	Nível de concentração 2 (ng/mL)
Modo positivo de ionização	Cumarina	50	1250
	7-hidroxycumarina	12,5	750
	6-metilcumarina*	500	500
Modo negativo de ionização	Ácido o-cumárico	25	750
	Ácido caurenóico	10	500
	Ácido isoferúlico*	1000	1000
	Prednisona*	500	500

\*padrão interno

Após a fortificação, as amostras foram agitadas em vórtex por 2 min, e em seguida extraídas com TBME ou acetonitrila, conforme descrito na Seção 3.6. As amostras foram mantidas no injetor automático do CLAE-EM/EM por 24 h (20 °C, vial transparente) e em seguida injetadas.

Os resultados obtidos com as amostras armazenadas no injetor automático foram comparados com a média dos valores obtidos com amostras de plasma recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado através do ER% e CV%, os quais não devem exceder 15% (BRASIL, 2012).

#### 3.7.9.5 Estabilidade das soluções estoque

A estabilidade das soluções estoque (1,0 mg/mL dos analitos e dos padrões internos) foi avaliada após 30 dias do armazenamento das soluções em refrigerador (4 °C, frasco âmbar). Decorrido os 30 dias, as soluções estoque foram retiradas do refrigerador, misturadas e diluídas com acetonitrila/água (70:30 v/v), de modo a obter os mesmos níveis de concentração descritos no ensaio de estabilidade de pós-processamento (Tabela 7). Os resultados obtidos com as soluções armazenadas no refrigerador foram comparados com a média dos valores obtidos com soluções recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado através do ER% e CV%, os quais não devem exceder 15% (BRASIL, 2012).

#### 3.7.9.6 Estabilidade das soluções de trabalho

A estabilidade das soluções de trabalho foi avaliada conforme procedimento descrito para as soluções estoque (item 3.7.9.5). No entanto, as soluções de trabalho permaneceram 6 h sobre a bancada (21 °C) antes das injeções.

---

---

### 3.8 SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

O estudo farmacocinético dos principais metabólitos do guaco e da 7-hidroxycumarina contou com a participação de 14 voluntários (ambos os sexos, idade entre 22 e 35 anos) que compareceram espontaneamente ao Centro de Estudos em Biofarmácia da UFPR (CEB-UFPR) após a divulgação da pesquisa por meio eletrônico. Os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) após receberem informações sobre a condução dos procedimentos e possíveis riscos relacionados ao estudo.

Foram considerados aptos a participarem do estudo os voluntários que atenderam os seguintes critérios:

- ✓ Não fumantes;
- ✓ Em bom estado de saúde;
- ✓ Peso dentro do ideal (calculado pelo Índice de Massa Corporal);
- ✓ Sem antecedentes de hipersensibilidade a medicamentos;
- ✓ Que não estavam fazendo uso de medicamentos;
- ✓ Ausência de patologias cardíacas, renais, gastrintestinais, neurológicas ou metabólicas;
- ✓ Voluntários do sexo feminino que não estivessem grávidas ou em período de amamentação.

A inclusão dos voluntários também foi baseada nos exames clínicos e laboratoriais (hemograma completo, ureia, creatinina, fosfatase alcalina, glicemia, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, transaminases, ácido úrico, colesterol total, triglicerídeos, urina tipo I,  $\beta$ -HCG (mulheres), eletrocardiograma e sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C). Todos os exames, exceto a sorologia para HIV,

---

hepatite B e hepatite C foram realizados também no período pós-estudo. Os dados demográficos dos voluntários investigados nesse estudo são apresentados na Tabela 8.

Todos os procedimentos conduzidos neste estudo contemplam as recomendações do Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade e Bioequivalência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil - ANVISA (BRASIL, 2002). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de ética da Universidade Federal do Paraná (CEP/SD 706041-005/ CAAE 0018.0.091.00-09).

TABELA 8. DADOS DEMOGRÁFICOS DOS VOLUNTÁRIOS INVESTIGADOS NO ESTUDO

Voluntário	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Altura (m)	IMC*
1	F	27	57	1,63	21,43
2	F	35	53	1,56	21,78
3	M	31	84	1,84	24,81
4	M	23	79	1,82	23,85
5	M	26	79	1,78	24,93
6	M	34	81	1,83	24,19
7	M	28	76	1,78	23,99
8	F	35	63	1,67	22,59
9	F	22	60	1,66	21,77
10	M	25	82	1,88	22,92
11	M	34	87	1,87	24,88
12	M	24	79	1,80	24,38
13	F	35	62	1,59	24,52
14	F	22	67	1,71	22,91
Média ± dp	-	28,6 ± 5,2	72,1 ± 11,26	1,74 ± 0,11	23,50 ± 1,24

\*Índice de massa corporal calculado através da massa/altura<sup>2</sup>. O IMC considerado para o estudo foi de 18,5 a 24,99, valores considerados normais de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2012)



### 3.9 DELINEAMENTO DO ESTUDO FARMACOCINÉTICO

O estudo farmacocinético dos principais metabólitos do guaco e da 7-hidroxycumarina foi realizado em três etapas onde os 14 voluntários selecionados foram divididos em três grupos:

- A primeira triagem foi realizada com cinco voluntários (duas mulheres e três homens) que receberam dose única de 60 mL de xarope de guaco;
- A segunda triagem foi conduzida com quatro voluntários (dois homens e duas mulheres) que receberam, respectivamente, 60 mL de xarope de guaco fortificado com 100, 500, 1000 ou 1500 mg de cumarina;
- Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados após a condução de um terceiro estudo o qual contou com a participação de 5 voluntários (três homens e duas mulheres) que receberam uma dose de 60 mL do xarope de guaco fortificado com 1500 mg de cumarina.

Todos os voluntários permaneceram em jejum (12 h) antes da administração do xarope. As amostras de sangue (3,0 mL) foram coletadas em tubos contendo edetato tetrasódico nos tempos 0, 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 240, 360, 480, 540 e 600 min após a administração do xarope. As amostras coletadas foram centrifugadas (4000 rpm, 5 min, temperatura ambiente) e os plasmas foram aliquotados e congelados a -40 °C até o momento das análises. Os voluntários foram privados de alimentação por um período de 6 horas após a administração do xarope. Após esse período, os voluntários receberam alimentação padronizada.

### 3.10 PREPARO DO XAROPE DE GUACO FORTIFICADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CUMARINA

O preparo do xarope de guaco fortificado com diferentes concentrações de cumarina encontra-se descrito no Quadro 3:

---

QUADRO 3. PREPARO DO XAROPE DE GUACO FORTIFICADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CUMARINA

Amostra	Volume do xarope de guaco	Quantidade de cumarina contida nos 54 mL de xarope	Fortificação	Concentração final do xarope
1	54 mL	15,85 mg	6 mL de solução etanólica contendo 84,15 mg de cumarina	60 mL de xarope contendo 100 mg de cumarina
2	54 mL	15,85 mg	6 mL de solução etanólica contendo 484,15 mg de cumarina	60 mL de xarope contendo 500 mg de cumarina
3	54 mL	15,85 mg	6 mL de solução etanólica contendo 984,15 mg de cumarina	60 mL de xarope contendo 1000 mg de cumarina
4	54 mL	15,85 mg	6 mL de solução etanólica contendo 1484,15 mg de cumarina	60 mL de xarope contendo 1500 mg de cumarina

### 3.11 PREPARO DAS AMOSTRAS DE PLASMA DOS VOLUNTÁRIOS

As amostras de plasma dos voluntários (-40 °C) foram descongeladas (temperatura ambiente) e aliquotadas (200 µL) em tubos de *Eppendorf*. As alíquotas foram fortificadas com 50 µL de acetonitrila/água (70:30 v/v) e 50 µL da solução do padrão interno, de modo a obter uma concentração final de 500 ng/mL de 6-metilcumarina (método utilizando ESI no modo positivo de ionização) ou 500 ng/mL de prednisona e 1000 ng/mL de ácido isoferúlico (método utilizando ESI no modo negativo de ionização). As amostras foram agitadas em vórtex (2 min) e em seguida extraídas com TBME ou acetonitrila, conforme descrito na Seção 3.6.

### 3.12 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA

Os perfis farmacocinéticos da cumarina e seus metabólitos (7-hidroxycumarina e ácido o-cumárico) foram avaliados após a administração oral de 60 mL de xarope de guaco fortificado com 1500 mg de cumarina (dose única). A dose de 1500 mg de cumarina foi calculada por extrapolação alométrica para humanos (WEST; BROWN,

2005; WHITE; SEYMOUR, 2005). O cálculo foi realizado a partir de um estudo disponível na literatura que demonstra a relação entre a dose da cumarina e o efeito broncodilatador que essa substância promoveu em porquinhos-da-índia (75 mg/kg) (RAMANITRAHASIMBOLA *et al.*, 2005).

A análise farmacocinética foi realizada por modelo não-compartimental, considerando via de administração extravascular, através do software WinNonLin Professional Network Edition (Versão 5.3). A relação entre as áreas sob a curva ( $r_{areas} = ASC_{0-t} / ASC_{0-inf}$ ) foi utilizada para verificar se o planejamento experimental foi adequado para a realização do cálculo dos parâmetros farmacocinéticos. A relação mínima de 0,8 entre as curvas demonstra planejamento experimental adequado. Os parâmetros farmacocinéticos determinados e as equações utilizadas para calcular esses parâmetros estão disponibilizados na Tabela 9:

TABELA 9. CÁLCULO E DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS AVALIADOS NO PRESENTE ESTUDO

Parâmetros	Descrição	Cálculo
$C_{max}$ (ng/mL)	Pico de concentração plasmática de uma substância	Determinado experimentalmente
$T_{max}$ (h)	Tempo em que o $C_{max}$ ocorreu	Determinado experimentalmente
$ASC_{0-t}$ (ng*h/mL)	Área sob a curva da concentração plasmática de um fármaco <i>versus</i> tempo	Calculada pelo método dos trapezoides
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h/mL)	Área sob a curva da concentração plasmática de um fármaco <i>versus</i> tempo extrapolado ao infinito	$(ASC_{0-t} + (C_{Pn}/k_{el}))$
$r_{areas}$	Relação entre a $ASC_{0-t}$ e a $ASC_{0-inf}$	$ASC_{0-t} / ASC_{0-inf}$
$T_{1/2}$ (h)	Meia vida de eliminação do fármaco	$T_{1/2} = L_n(2) / k_{el}$
$K_{el}$ (1/h)	Constante de eliminação	Determinada por regressão log-linear
$Vd/f$ (L)	Volume de distribuição aparente	$Cl/K_{el}$
$Cl/f$ (L/h)	<i>Clarence</i>	$[(Dose)/ASC_{inf}]$

---

## ***4. RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---

---

#### 4.1 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS POR CLAE-EM/EM

A primeira etapa para o desenvolvimento dos métodos por CLAE-EM/EM foi a escolha da fonte de ionização do espectrômetro de massas. Em nosso estudo, a fonte escolhida foi a *Electrospray* (ESI) em virtude das atribuições de robustez, sensibilidade, capacidade de trabalhar com matrizes complexas e alta performance na ionização de compostos.

A próxima etapa foi a checagem do sinal dos analitos. Neste ensaio soluções de trabalho contendo 100 ng/mL dos analitos e dos padrões internos foram preparadas e infundidas separadamente no espectrômetro de massas. Foram avaliados o modo de ionização e a intensidade e a estabilidade do sinal dos analitos.

Uma vez checado o sinal dos analitos, alguns ajustes de concentração das soluções foram realizados a fim de garantir uma intensidade de sinal adequada entre  $2 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  cps, intensidade esta recomendada pelo fabricante do equipamento para otimização automática dos parâmetros individuais dos compostos via Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM).

O modo positivo de ionização foi o mecanismo mais eficiente para ionizar a cumarina, a 7-hidroxycumarina e a 6-metilcumarina (PI) enquanto que o modo negativo de ionização foi o mais eficiente para ionizar os ácidos o-cumárico, caurenóico, isoferúlico (PI) e a prednisona (PI). Ao término das otimizações foram obtidos os dois fragmentos de íons mais intensos de cada composto. O fragmento de maior intensidade foi utilizado para quantificação, enquanto que o segundo maior em intensidade para qualificação dos compostos. O único composto que não foi monitorado através dos íons fragmentos foi o ácido caurenóico, o qual apresentou uma baixa intensidade de sinal mesmo após exaustivas tentativas de otimização. Para este composto apenas o íon molecular foi monitorado ( $m/z$  301,1).

A próxima etapa de otimização do espectrômetro de massas foi o ajuste dos parâmetros da fonte de ionização. Esse ajuste foi realizado através de análises por injeção em fluxo (FIA), acoplando o CLAE ao espectrômetro de massas, sem o uso de coluna cromatográfica. A fase móvel consistiu de uma mistura de acetonitrila e água (50:50 v/v) contendo 0,05% de ácido fórmico, ou acetonitrila e água (50:50 v/v) contendo 1 mM de formiato de amônio, de acordo com as características de

---

ionização de cada composto. O fluxo foi mantido em 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  e os parâmetros da fonte de ionização ajustados automaticamente.

Ao término das otimizações do espectrômetro de massas, os métodos por CLAE-EM/EM foram desenvolvidos. Os primeiros ensaios foram realizados com a fonte de ionização (ESI) operando no modo positivo. Nesse método foram monitorados a cumarina e a 7-hidroxicumarina utilizando, para ambas as substâncias, o padrão interno 6-metilcumarina. A coluna utilizada foi uma XBridge Shield RP18 150 x 2,1 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula, mantida a 25 °C. Para compor a fase móvel, diversas combinações de água e acetonitrila (50 a 80%) foram utilizadas, mantendo como aditivo 0,05% de ácido fórmico. Em todas as condições o modo de eluição foi isocrático com fluxo mantido em 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Conforme demonstrado na Figura 7, os picos cromatográficos permaneceram simétricos independente da proporção de água ou acetonitrila utilizada para compor a fase móvel. Os testes também demonstraram que a intensidade do sinal da cumarina é reduzida quando proporções de água acima de 65% são utilizadas para compor a fase móvel. Dentre as fases móveis testadas, a melhor composição que garantiu uma boa cromatografia sem perdas adicionais de sensibilidade foi acetonitrila/água/ácido fórmico nas proporções 65:35:0,05 v/v/v (Figura 7).

Com o objetivo de otimizar o tempo de corrida, a vazão do fluxo foi aumentada gradativamente de 200 para 350  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Os experimentos demonstraram que o aumento no fluxo pode reduzir significativamente o tempo de corrida, mas em contrapartida a exatidão dos resultados pode ser comprometida devido ao deslocamento do pico da 7-hidroxicumarina para o volume morto (Figura 8). O fluxo da fase móvel selecionado permaneceu, portanto, em 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

A temperatura de forno também foi variada durante o desenvolvimento do método (25 - 40 °C), porém tal como no aumento do fluxo nenhum progresso foi alcançado com essas alterações. O tempo de corrida praticamente não modificou e nenhuma melhora significativa foi observada quanto à simetria dos picos cromatográficos (Figura 9). Assim a temperatura de forno escolhida para o método foi de 25 °C.

---

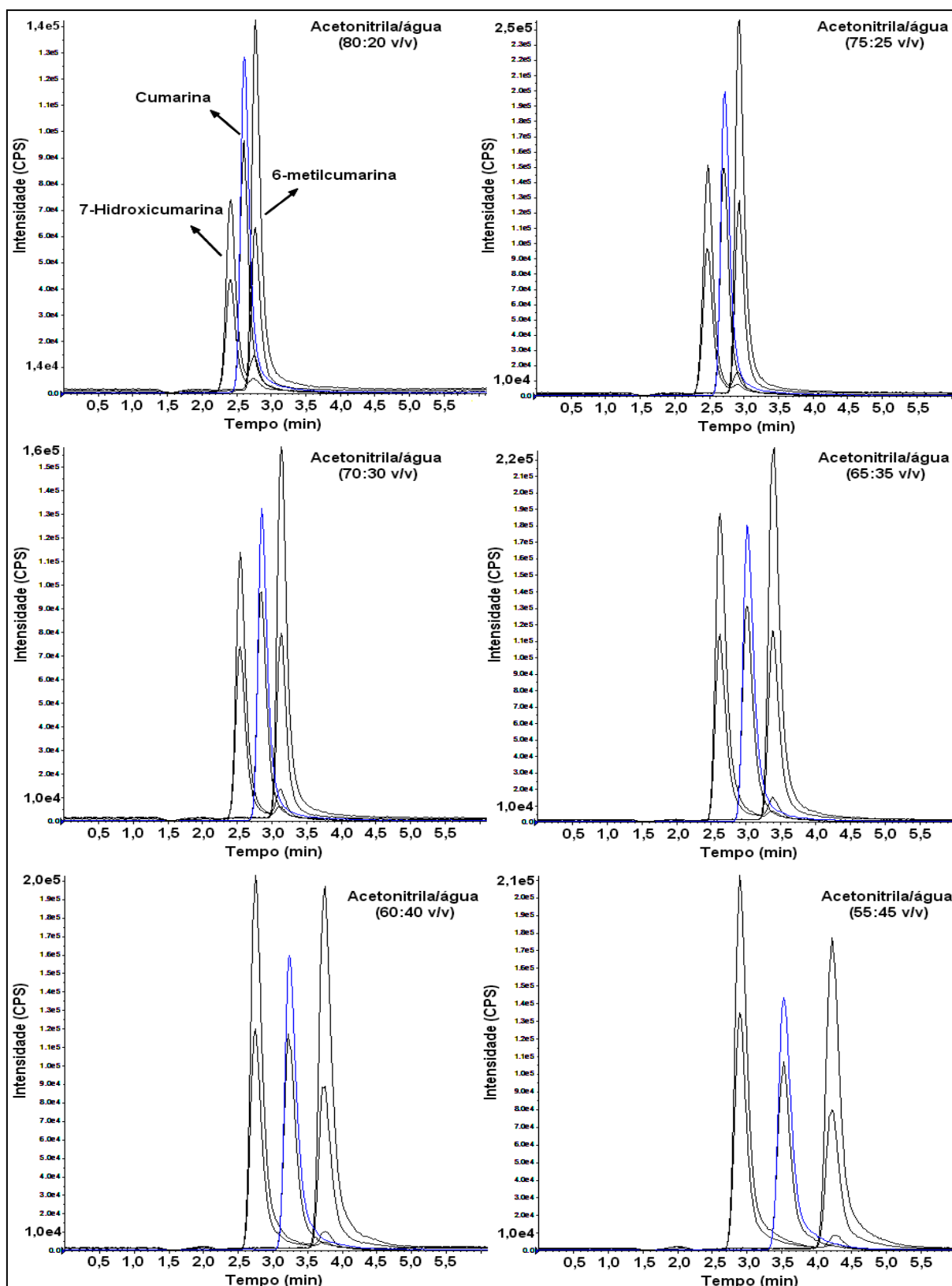


FIGURA 7 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS COM AMOSTRAS DE PLASMA FORTIFICADAS COM CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E 6 METILCUMARINA (PI), UTILIZANDO DIFERENTES PROPORÇÕES DE ACETONITRILA E ÁGUA (AMBOS CONTENDO 0,05% DE ÁCIDO FÓRMICO) NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL. Dados: Coluna XBridge Shield RP18 150 x 2,1 mm mantida a 25 °C, fluxo da fase móvel de 200  $\mu$ L/min

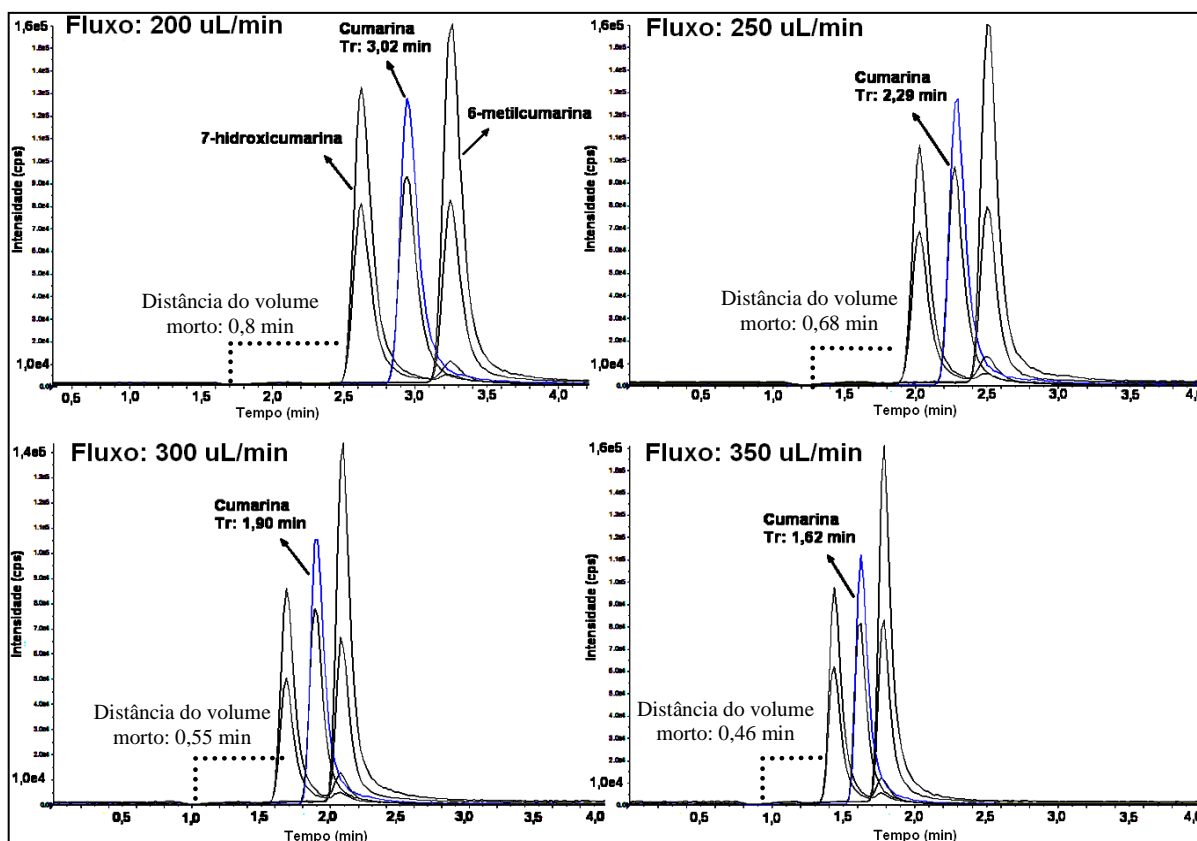


FIGURA 8 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS COM AMOSTRAS DE PLASMA FORTIFICADAS COM CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E 6-METILCUMARINA, UTILIZANDO DIFERENTES FLUXOS DA FASE MÓVEL. Dados: CLAE-EM/EM, fonte operando no modo positivo de ionização, coluna XBridge Shield RP18 150 x 2,1 mm mantida a 25 °C; fase móvel isocrática composta de acetonitrila/água/ácido fórmico (65:35:0,05 v/v/v)

Ao término dos ajustes cromatográficos, as melhores condições para a determinação em plasma da cumarina e da 7-hidroxicumarina foram alcançadas através de coluna XBridge Shield RP18 (150 x 2,1 mm) mantida a 25 °C, e fase móvel isocrática composta de acetonitrila/água/ácido fórmico (65:35:0,05 v/v/v) eluída a 200 µL/min. O cromatograma obtido com o método desenvolvido é apresentado na Figura 10.



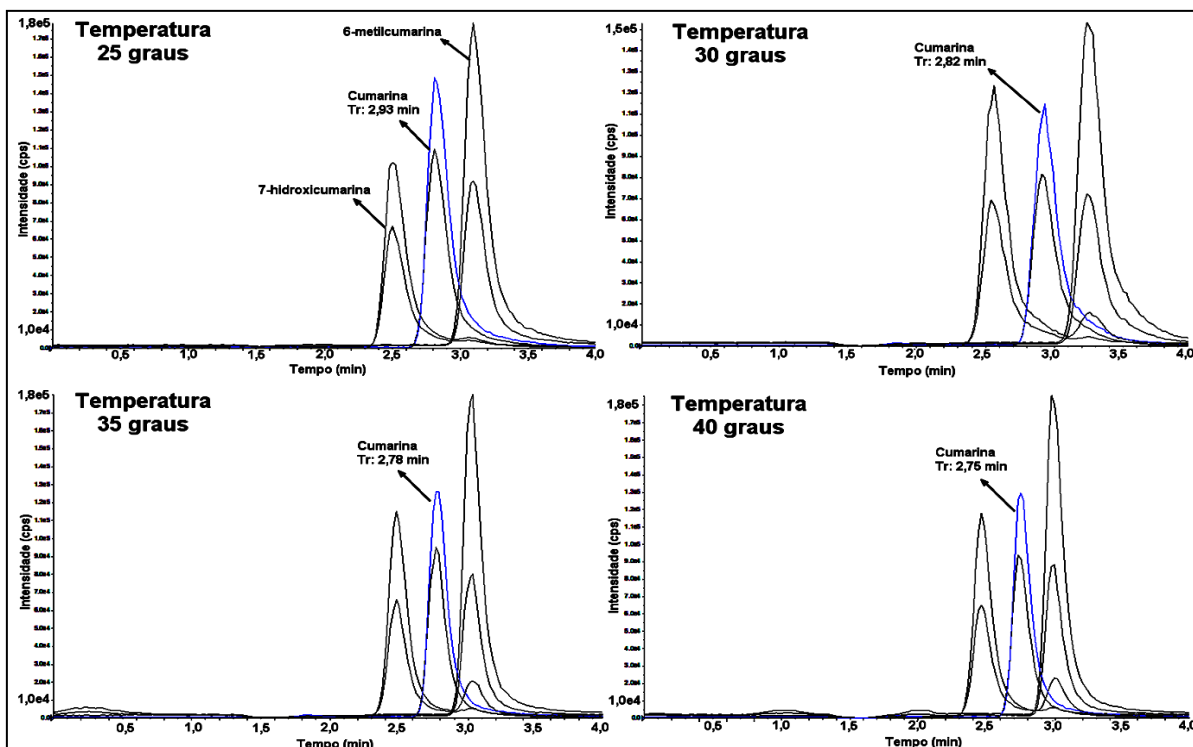


FIGURA 9 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS COM AMOSTRAS DE PLASMA FORTIFICADAS COM CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E 6-METILCUMARINA, UTILIZANDO DIFERENTES TEMPERATURAS NA COLUNA. Dados: CLAE-EM/EM; modo positivo de ionização, coluna XBridge Shield RP18 (150 x 2,1 mm) e fase móvel isocrática composta de acetonitrila/água/ácido fórmico (65:35:0,05 v/v/v) eluída a 200  $\mu$ L/min

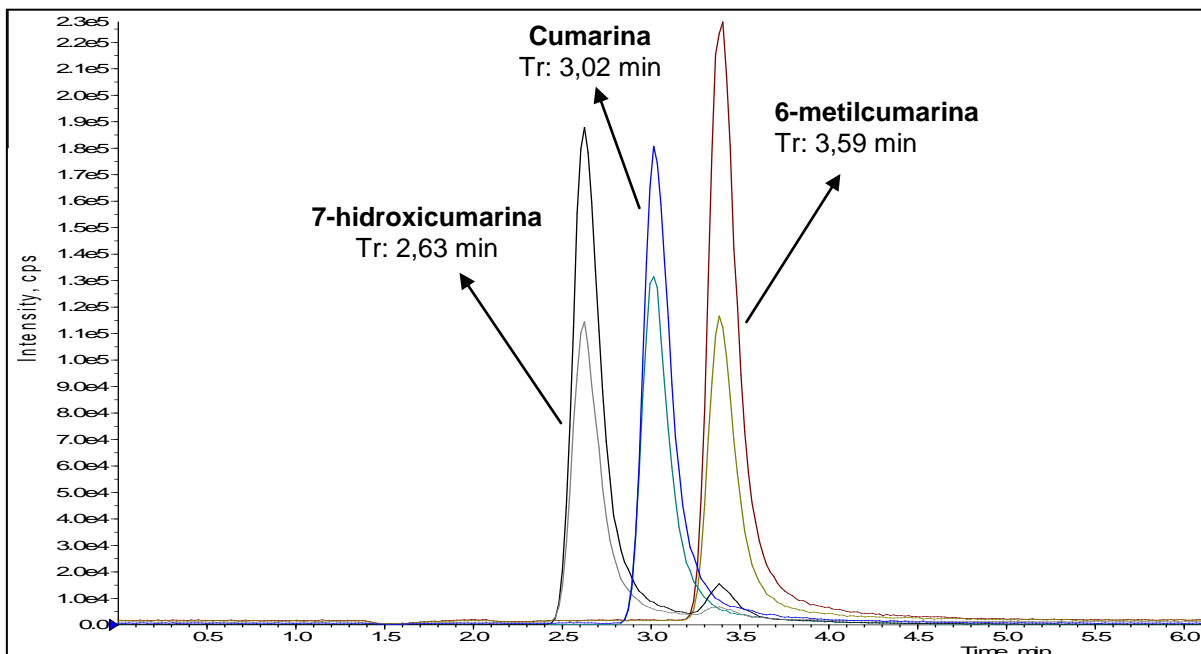


FIGURA 10 – CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E 6 METILCUMARINA OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM COM O MÉTODO OTIMIZADO. Dados: modo positivo de ionização; fase móvel: acetonitrila/água/ácido fórmico (65:35:0,05 v/v/v) eluída a 200  $\mu$ L/min; Coluna: XBridge Shield RP18 (150 x 2,1 mm) mantida a 25 °C

O segundo método desenvolvido utilizou a fonte ESI no modo negativo de ionização. Nesse método os compostos monitorados foram os ácidos *o*-cumárico e caurenóico, utilizando respectivamente como padrão interno o ácido isoferúlico e a prednisona.

O desenvolvimento do método utilizou como ponto de partida uma coluna XBridge Shield RP18 150 x 2,1 mm, 5 µm de tamanho de partícula, mantida a 25 °C. Para compor a fase móvel, diversas combinações de água e solução acetonitrila/água 95:5 v/v (1mM de formiato de amônio) foram utilizadas. O fluxo variou de 200 a 400 µL/min. Sob todas as condições testadas não foi possível obter um cromatograma adequado utilizando fase móvel isocrática, pois dependendo do ajuste a corrida se tornava excessivamente longa, ou havia comprometimento da cromatografia devido os analitos eluírem no tempo morto (dados não apresentados). Portanto, o desenvolvimento do método só foi possível utilizando fase móvel eluída em modo gradiente.

As primeiras injeções no modo gradiente de eluição foram realizadas com fase móvel iniciando com 75% de água e 35% de solução acetonitrila/água 95:5 v/v (1mM de formiato de amônio), eluída a 400 µL/min. Após 1 min de corrida, a proporção de água foi reduzida para 5%, e nessas condições todos os compostos eluíram em menos de 8 min (Figura 11). O resultado foi considerado satisfatório, porém um alargamento na base dos picos dos ácidos *o*-cumárico e isoferúlico foi observado. Na tentativa de melhorar a simetria desses picos, a temperatura da coluna foi variada de 30 até 40 °C, porém nenhum avanço foi obtido (Figura 11). Por fim um excelente perfil dos picos cromatográficos foi alcançado reduzindo a proporção da fase aquosa no início da corrida de 75 para 70% e mantendo a coluna em 35 °C.

As melhores condições para quantificação em plasma dos ácidos *o*-cumárico e caurenóico foram então obtidas utilizando coluna XBridge Shield RP18 (150 x 2,1 mm) mantida a 35 °C, e fase móvel composta de (A) água e (B) solução acetonitrila/água 95:5 v/v, ambos contendo 1mM de formiato de amônio. O fluxo foi de 400 µL/min e o perfil do gradiente de eluição conforme segue: Tempo 0–1,0min: A=70%; Tempo 1,0–1,1min: A=5%; Tempo 1,1–5,0min: A=5%; Tempo 5,0–5,1min: A=70%; Tempo 5,1–9,0min: A=70%. O cromatograma obtido com o método otimizado é apresentado na Figura 12.

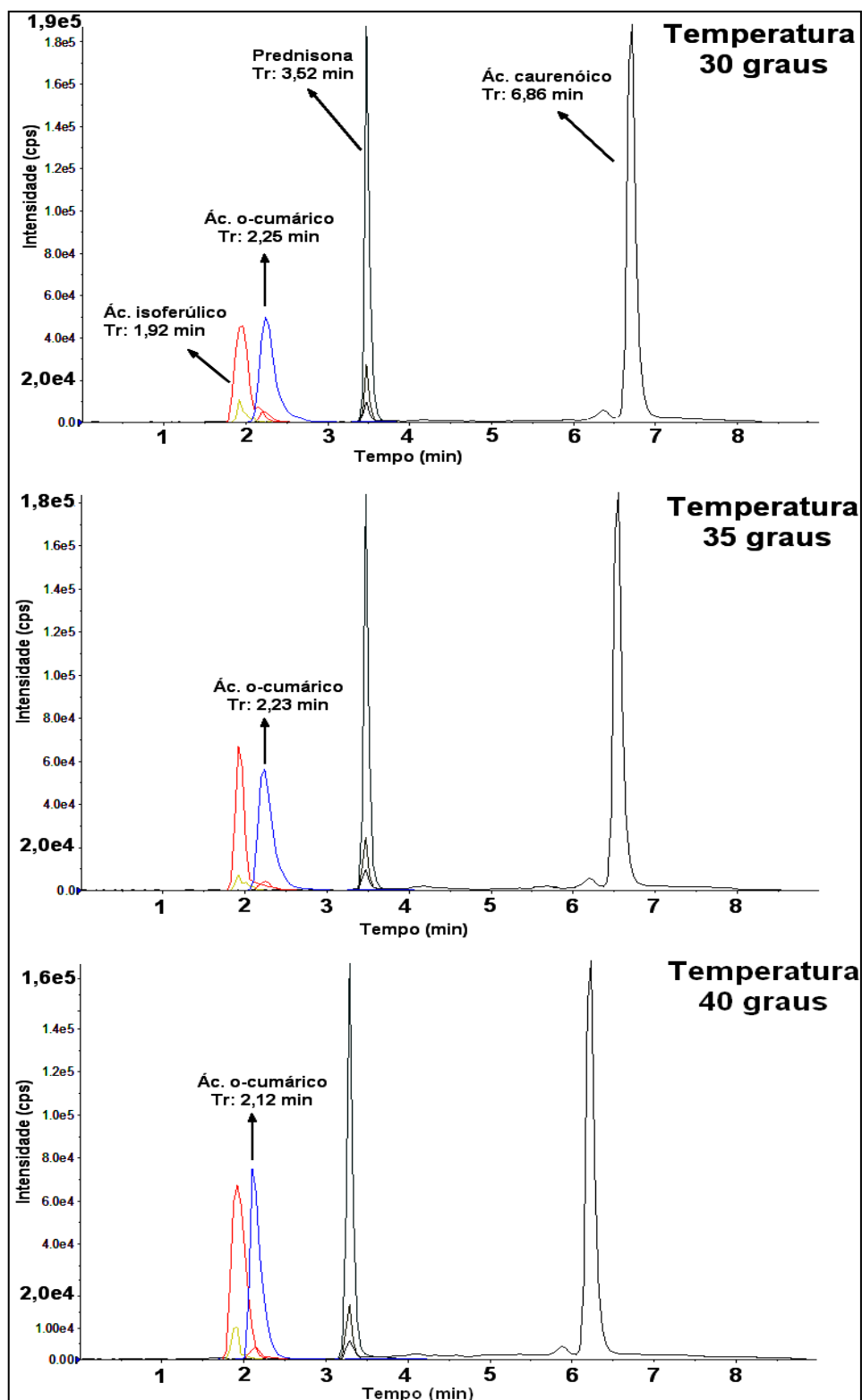


FIGURA 11 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS COM AMOSTRAS DE PLASMA FORTIFICADAS COM ÁCIDO O-CUMÁRICO, ÁCIDO CAURENÓICO, ÁCIDO ISOFERÚLICO E PREDNISONA UTILIZANDO DIFERENTES TEMPERATURAS NA COLUNA. Dados: CLAE-EM/EM; modo negativo de ionização; coluna XBridge Shield RP18 (150 x 2,1 mm) mantida a 35 °C; fase móvel composta de (A) água e (B) solução acetonitrila/água 95:5 v/v, ambos contendo 1mM de formiato de amônio; fluxo de 400 µL/min, perfil do gradiente: Tempo 0–1,0min: A=75%; Tempo 1,0–1,1min: A=5%; Tempo 1,1–5,0min: A=5%; Tempo 5,0–5,1min: A=75%; Tempo 5,1–9,0min: A=75%

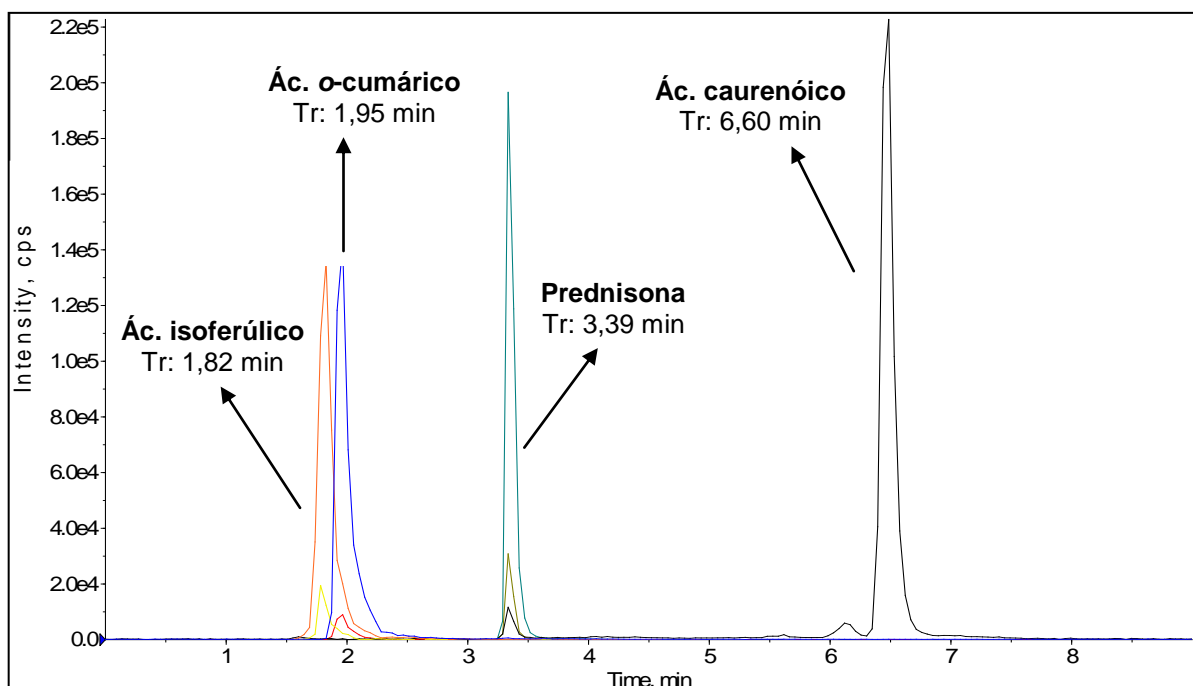


FIGURA 12 – CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM OS ÁCIDOS O-CUMÁRICO, CAURENÓICO, ISOFERÚLICO (PI) E PREDNISONA (PI) OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM COM O MÉTODO OTIMIZADO. Dados: modo negativo de ionização; coluna XBridge Shield RP18 (150 x 2,1 mm); fase móvel composta de (A) água e (B) solução acetonitrila/água 95:5 v/v, ambos contendo 1mM de formiato de amônio; fluxo de 400  $\mu$ L/min; perfil do gradiente: Tempo 0–1,0min: A=70%; Tempo 1,0–1,1min: A=5%; Tempo 1,1–5,0min: A=5%; Tempo 5,0–5,1min: A=70%; Tempo 5,1–9,0min: A=70%

Em relação aos métodos desenvolvidos, estes apresentaram diversos benefícios frente a outros disponíveis na literatura. Para determinação em plasma da cumarina e 7-hidroxycumarina, o uso do CLAE-EM/EM demonstrou uma excelente seletividade com níveis de detecção 100 vezes maior que os métodos desenvolvidos por CLAE-DAD (RITSCHER *et al.*, 1977; RITSCHER; HOFFMAN, 1981; EGAN; O'KENNEDY, 1992; BOGAN; O'KENNEDY, 1996; FORD *et al.*, 2001). Esse método é também o único totalmente validado de acordo com as normas modernas de regulamentação, traduzindo em resultados confiáveis.

Quanto ao método desenvolvido para determinação em plasma dos ácidos o-cumárico e caurenóico, este é o único disponível para sua finalidade. Os novos métodos também foram considerados ambientalmente corretos por utilizarem baixos fluxos, pequenas quantidades de solvente orgânico e corridas analíticas consideravelmente curtas. Considerando a rapidez, seus aspectos cromatográficos e resposta na validação, os novos métodos podem ser utilizados com segurança para

determinação em plasma da cumarina, 7-hidroxicumarina, ácido o-cumárico e ácido caurenóico.

#### 4.2 TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR A MELHOR FORMA DE EXTRAIR DO PLASMA A CUMARINA, A 7-HIDROXICUMARINA E OS ÁCIDOS CAURENÓICO E O-CUMÁRICO

De modo a obter a melhor recuperação dos analitos com desejada precisão, algumas técnicas de extração foram testadas, incluindo extração em fase sólida, precipitação de proteínas (com acetonitrila) e extração líquido-líquido com TBME, clorofórmio, acetato de etila e mistura éter/hexano (70:30 v/v). A recuperação dos analitos e dos padrões internos foi expressa através de gráfico de barras (Figura 13), enquanto que as variações obtidas com cada analito, em cada procedimento de extração, através da barra de erros (CV%).

Dentre as técnicas de extração testadas, a extração em fase sólida (SPE) apresentou uma boa reprodutibilidade na extração da cumarina e 7-hidroxicumarina (CV de 4,64 e 2,51%, respectivamente). No entanto, a presença de interferentes endógenos foi observada no mesmo tempo de retenção da 6-metilcumarina (PI) (dado não demonstrado), fato que inviabilizou as análises. Além disso, a SPE não foi efetiva para extrair do plasma os ácidos o-cumárico e isoferúlico (PI) (Figura 13B), e grandes variações foram observadas na extração do ácido caurenóico e da prednisona (PI) quando essa técnica foi utilizada (CV: 34,66%).

Em termos quantitativos, a extração líquido-líquido com TBME foi a técnica mais efetiva para extrair do plasma a cumarina, a 7-hidroxicumarina e a 6-metilcumarina (Figura 13A). Essa também foi a técnica que apresentou a maior reprodutibilidade na extração dessas substâncias (CV de 2,37% para cumarina, 2,11% para a 7-hidroxicumarina e 2,11% para 6-metilcumarina). Portanto, a extração líquido-líquido com TBME foi eleita a técnica mais adequada para extrair do plasma a cumarina, a 7-hidroxicumarina e a 6-metilcumarina (PI).

Em relação aos ácidos o-cumárico e isoferúlico, a extração líquido-líquido não foi efetiva em termos quantitativos (Figura 13B). Além disso, grandes variações na extração do ácido caurenóico e prednisona (PI) foram observadas quando essa téc-

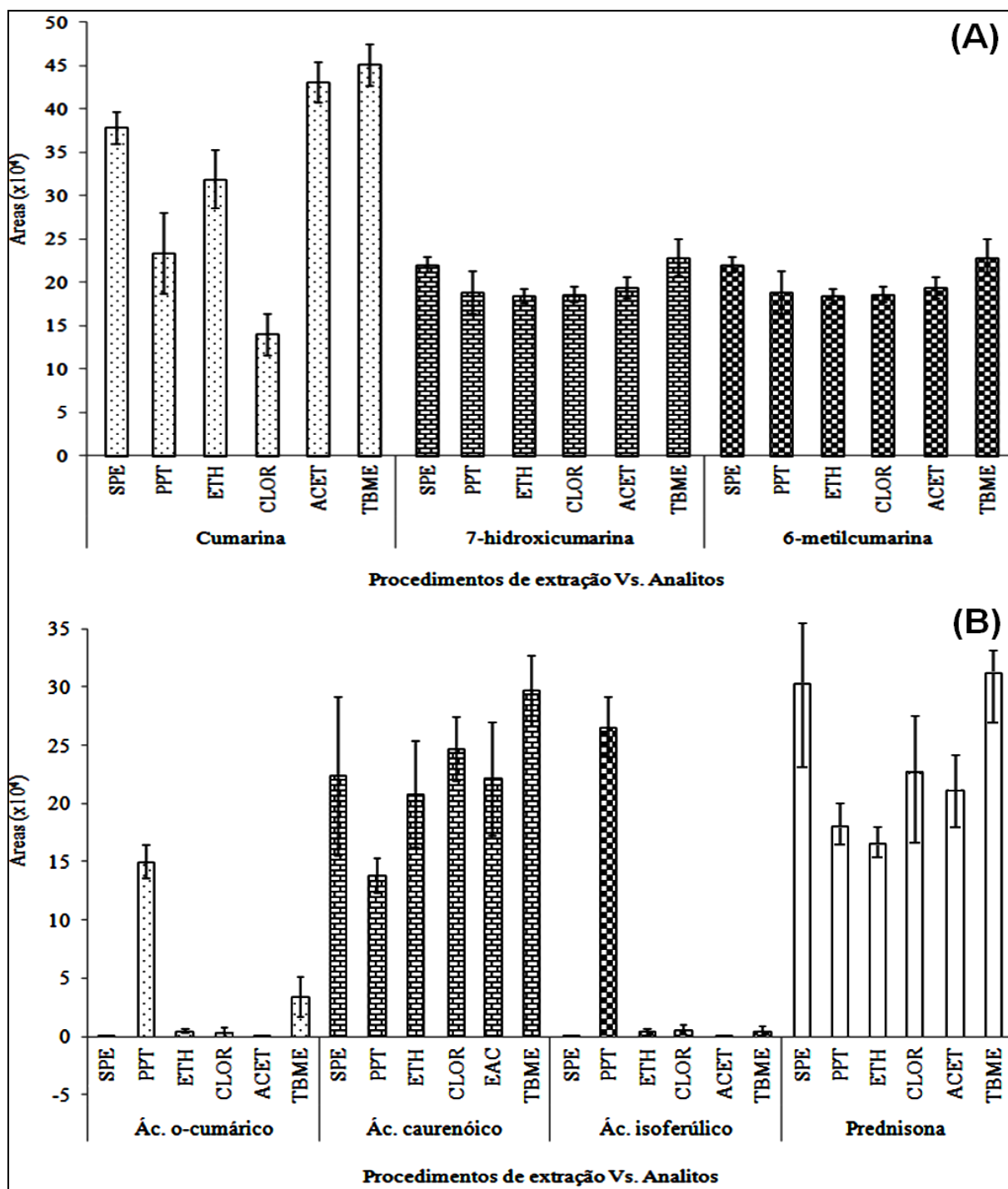


FIGURA 13. RECUPERAÇÃO DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA, 6-METILCUMARINA (IS), ÁCIDO O-CUMÁRICO, ÁCIDO CAURENÓICO, ÁCIDO ISOFERÚLICO (IS) E PREDNISONA (IS) OBTIDA EM PLASMA COM DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO. Dados: SPE: extração em fase sólida, PPT: precipitação de proteínas com acetonitrila, ETH: extração líquido-líquido com éter/hexano (70:30 v/v), CLOR: extração líquido-líquido com clorofórmio, ACET: extração líquido-líquido com acetato de etila; TBME: extração líquido-líquido com *tert*-butil metil éter. (A) método utilizando ESI no modo positivo de ionização e (B) método utilizando ESI no modo negativo de ionização.

nica foi utilizada (Figura 13B). Nesse contexto, a única técnica de extração eficiente e reprodutível para extrair do plasma a prednisona (CV= 2,24%) e os ácidos  $\alpha$ -cumárico (CV= 1,41%), isoferúlico (CV= 2,56%) e caurenóico (CV= 1,48%) foi a precipitação de proteínas com acetonitrila (PPT) (Figura 13B). Por esse motivo a PPT foi escolhida como técnica padrão para extrair do plasma essas substâncias.

### 4.3 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS

#### 4.3.1 Seletividade

Os cromatogramas obtidos com plasma normal, hemolisado, lipêmico e plasma normal fortificado com analitos e PI são apresentados nas Figuras 14 e 15. Conforme demonstrado, nenhum interferente endógeno foi observado nos mesmos tempos de retenção dos analitos e dos padrões internos. Portanto os métodos foram considerados seletivos.

---

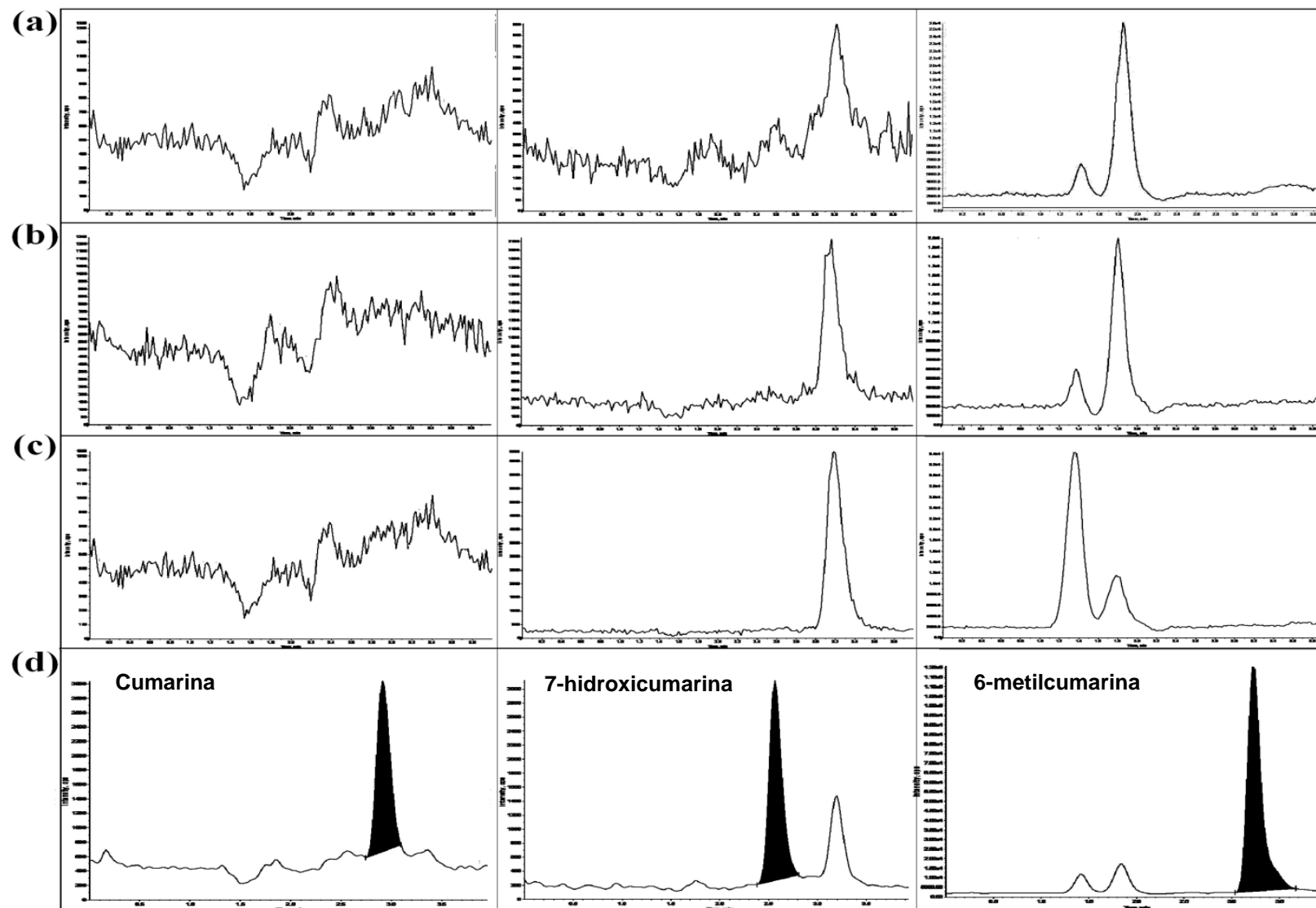


FIGURA 14: CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) PARA O ESTUDO DA SELETIVIDADE. Dados: (a) plasma branco normal, (b) plasma branco lipêmico, (c) plasma branco hemolisado, (d) plasma branco normal fortificado com 10 ng/ml de cumarina, 7,5 ng/ml de 7-hidroxycumarina e 500 ng/ml do padrão interno 6-metilcumarina



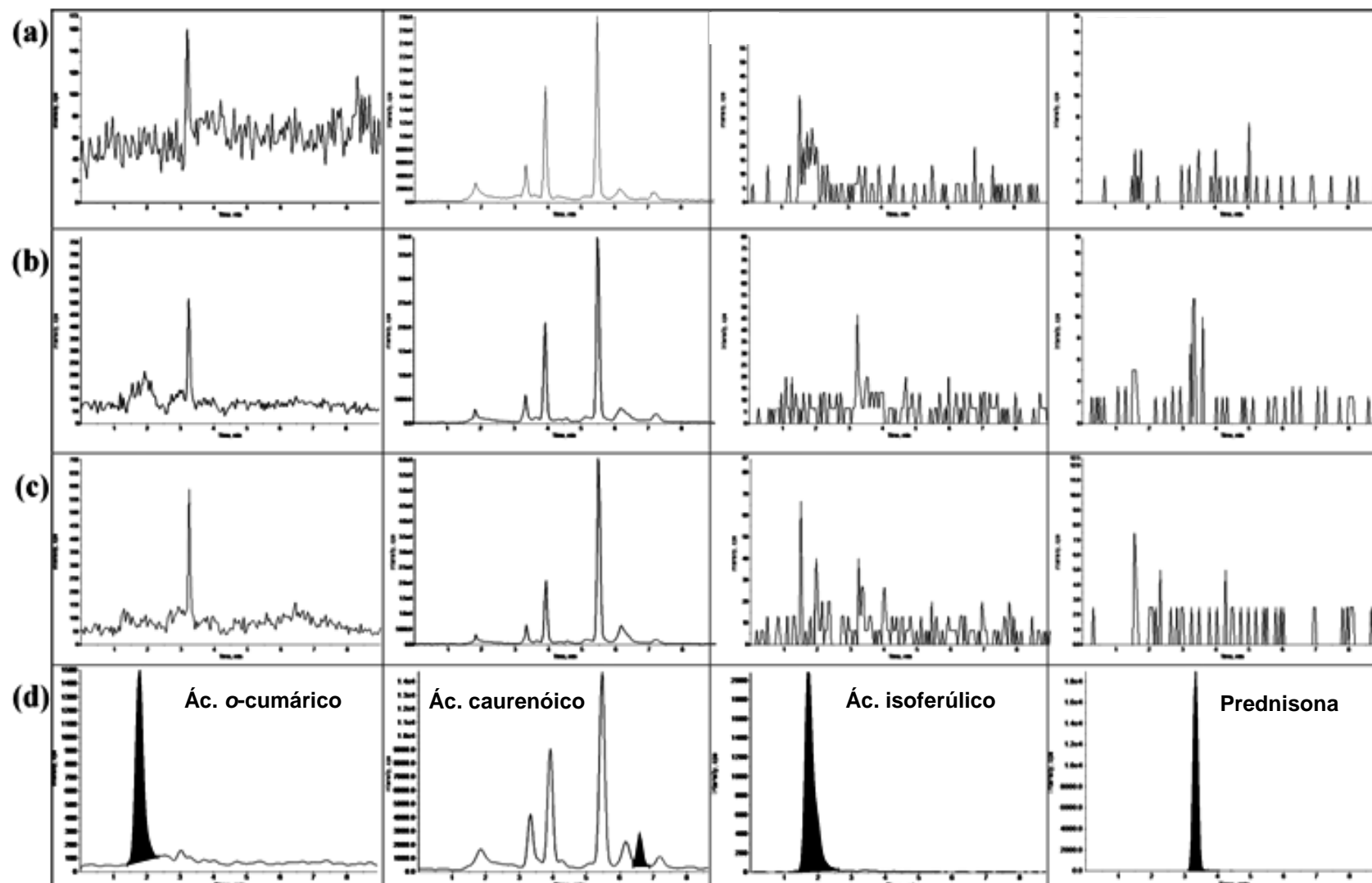


FIGURA 15: CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI-) PARA O ESTUDO DE SELETIVIDADE. Dados: (a) plasma branco normal, (b) plasma branco lipêmico, (c) plasma branco hemolisado, (d) plasma branco normal fortificado com 10 ng/ml de ácido *o*-cumárico, 5,0 ng/ml de ácido caurenóico, 1000 ng/ml de padrão interno ácido isoferúlico e 500 ng/ml do padrão interno prednisona

#### 4.3.2 Limite de detecção e limite inferior de quantificação

A alta sensibilidade dos métodos desenvolvidos foi demonstrada através dos baixos limites de detecção (sinal-ruído > 3) estimados em 1,5 ng/mL para o ácido caurenóico, 2,5 ng/mL para 7-hidroxycumarina, 2,5 ng/mL para o ácido o-cumárico e 3,0 ng/mL para a cumarina. O limite inferior de quantificação baseado na relação sinal-ruído > 10 com desejável precisão (CV < 10%) foi estimado em 5,0 ng/mL para o ácido caurenóico, 7,5 ng /mL para a 7-hidroxycumarina, 10,0 ng/mL para o ácido o-cumárico e 10,0 ng/mL para a cumarina.

#### 4.3.3 Linearidade

Conforme demonstrado nas Figuras 16, 17, 18 e 19, as curvas de calibração apresentaram excelente linearidade com coeficientes de correlação ( $r$ ) > 0.997 para todos os compostos. Para cada curva, em cada nível de concentração, as variações de precisão e exatidão foram menores que 10% (Tabelas 10, 11, 12 e 13). Esses resultados indicam uma resposta confiável dentro dos limites de concentração estabelecidos.

---

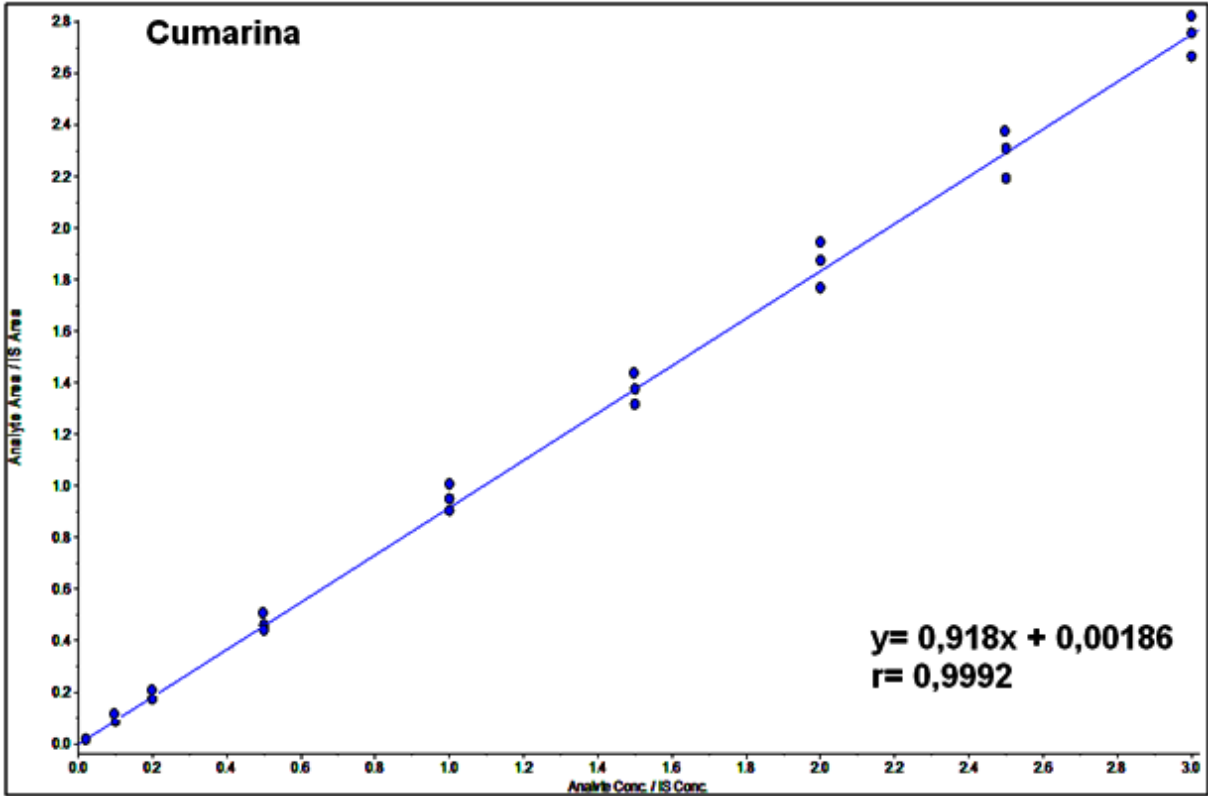


FIGURA 16: EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E GRÁFICO DE LINEARIDADE DA CUMARINA OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X. Dados: Gráfico obtido através de uma curva de calibração preparada em plasma, em triplicata e em nove níveis de concentração. Os valores expressos da equação da reta e do coeficiente de correlação são referentes a média dos resultados obtidos através das injeções realizadas durante cinco dias consecutivos

TABELA 10 - VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CUMARINA

Composto	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Cumarina	10,00	10,26	0,531	5,17	2,62
	50,00	49,86	1,677	3,36	-0,28
	100,00	97,03	2,152	2,22	-2,97
	250,00	246,88	7,674	3,11	-1,25
	500,00	506,31	17,274	3,41	1,26
	750,00	734,76	22,831	3,11	-2,03
	1000,00	1058,90	50,989	4,82	5,89
	1250,00	1227,51	44,472	3,62	-1,80
	1500,00	1478,51	34,554	2,34	-1,43

Dados: <sup>a</sup>Coeficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo

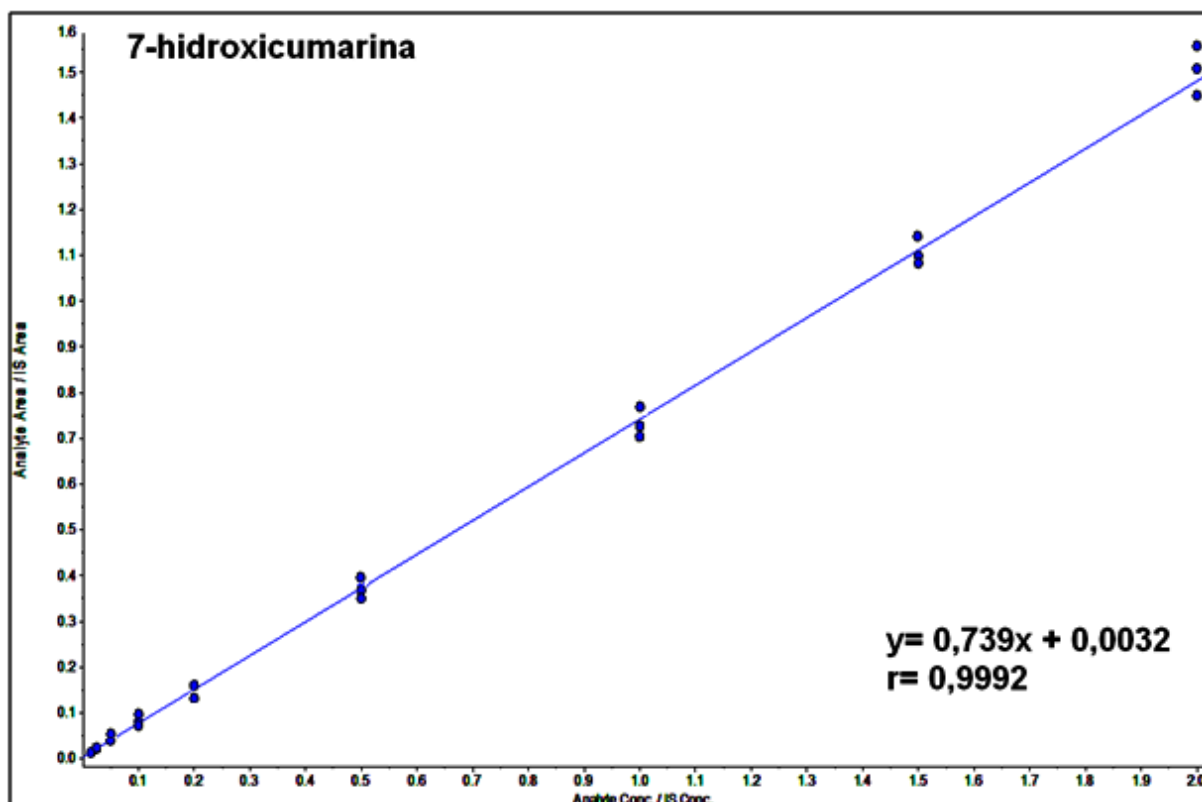


FIGURA 17: EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E GRÁFICO DE LINEARIDADE DA 7-HIDROXICUMARINA OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X. Dados: Gráfico obtido através de uma curva de calibração preparada em plasma, em triplicada, em nove níveis de concentração. Os valores expressos da equação da reta e do coeficiente de correlação são referentes a média dos resultados obtidos através das injeções realizadas durante cinco dias consecutivos

TABELA 11 - VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA 7-HIDROXICUMARINA

Composto	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
7-hidroxycumarina	7,50	7,00	0,339	4,84	-6,68
	12,50	13,30	0,874	6,57	6,41
	25,00	25,03	0,206	0,82	0,13
	50,00	49,83	4,224	8,48	-0,33
	100,00	106,06	0,276	0,26	6,06
	250,00	241,02	8,553	3,55	-3,59
	500,00	481,84	10,722	2,23	-3,63
	750,00	735,89	7,566	1,03	-1,88
	1000,00	1035,03	23,490	2,27	3,50

Dados: <sup>a</sup>Coeficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo

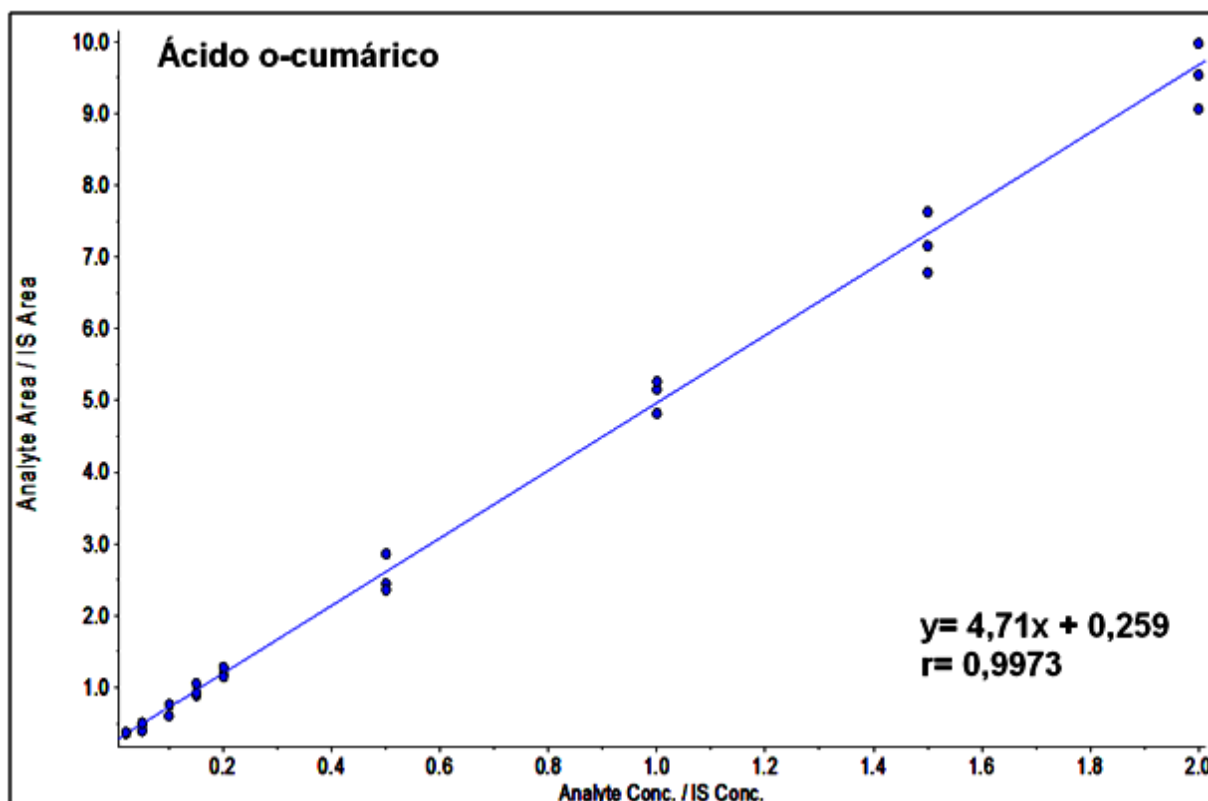


FIGURA 18: EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E GRÁFICO DE LINEARIDADE DO ÁCIDO O-CUMÁRICO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X. Dados: Gráfico obtido através de uma curva de calibração preparada em plasma, em triplicada, em nove níveis de concentração. Os valores expressos da equação da reta e do coeficiente de correlação são referentes a média dos resultados obtidos através das injeções realizadas durante cinco dias consecutivos

TABELA 12 - VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO O-CUMÁRICO

Composto	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Ácido o-cumárico	10,00	10,13	0,966	9,54	1,26
	25,00	23,96	1,494	6,24	-4,17
	50,00	52,55	0,280	0,53	5,10
	75,00	72,91	9,203	12,62	-2,79
	100,00	99,46	7,291	7,33	-0,54
	250,00	243,42	28,722	11,80	-2,63
	500,00	537,48	21,435	3,99	7,50
	750,00	736,00	45,231	6,15	-1,87
	1000,00	984,61	48,660	4,94	-1,54

Dados: <sup>a</sup>Coeficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo

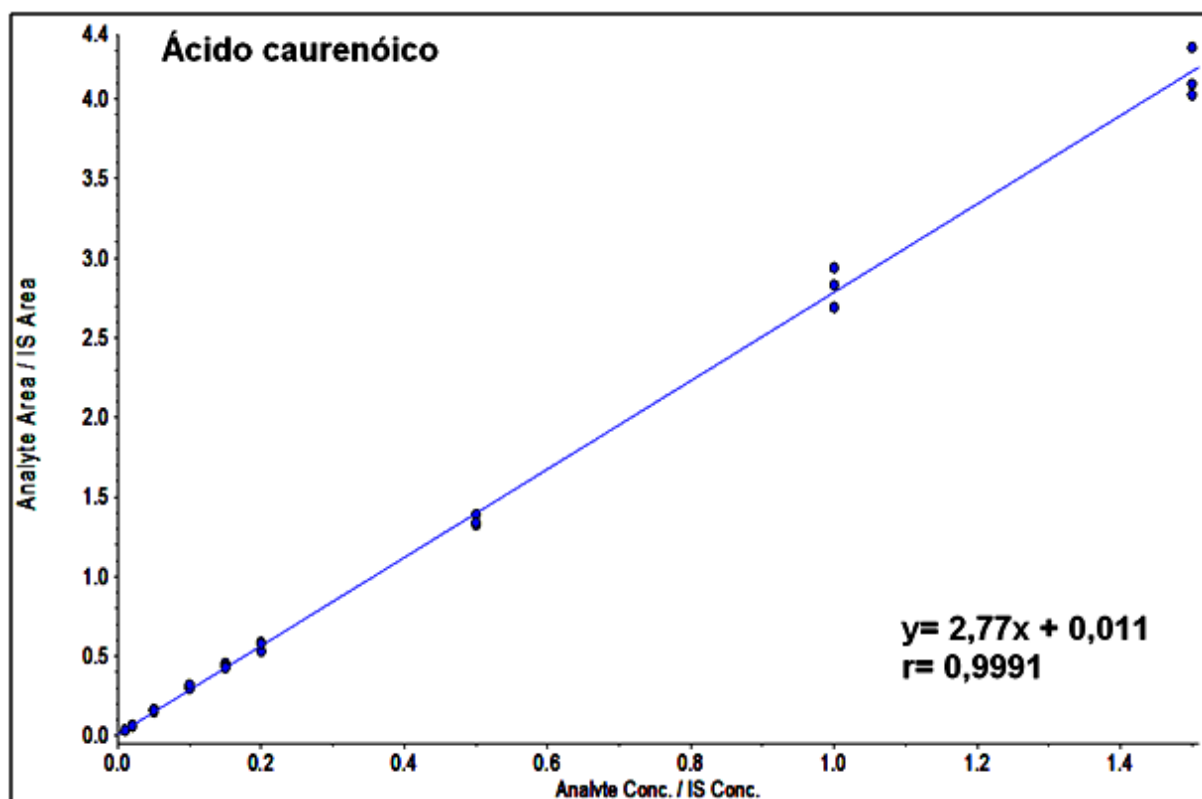


FIGURA 19: EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E GRÁFICO DE LINEARIDADE DO ÁCIDO CAURENÓICO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X. Dados: Gráfico obtido através de uma curva de calibração preparada em plasma, em triplicada, em nove níveis de concentração. Os valores expressos da equação da reta e do coeficiente de correlação são referentes a média dos resultados obtidos através das injeções realizadas durante cinco dias consecutivos

TABELA 13 - VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO CAURENÓICO

Composto	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Ácido caurenóico	5,00	4,50	0,474	10,55	-10,05
	10,00	9,47	0,349	3,69	-5,29
	25,00	26,92	1,367	5,08	7,69
	50,00	53,54	2,199	4,11	7,07
	75,00	77,48	2,501	3,23	3,31
	100,00	100,01	5,590	5,59	0,01
	250,00	241,65	6,063	2,51	-3,34
	500,00	506,17	22,477	4,44	1,23
	750,00	745,27	28,258	3,79	-0,63

Dados: <sup>a</sup>Coeficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo

4.3.4 Teste de efeito residual (*Carry over test*)

Os cromatogramas obtidos com injeções alternadas de plasma branco e amostras de plasma preparadas no nível mais alto de concentração da curva de calibração são apresentados nas Figuras 20 e 21. Nenhum pico interferente foi observado no mesmo tempo de retenção dos analitos e dos padrões internos, não havendo, portanto, risco de contaminação causada pelo arraste dos analitos entre as injeções.

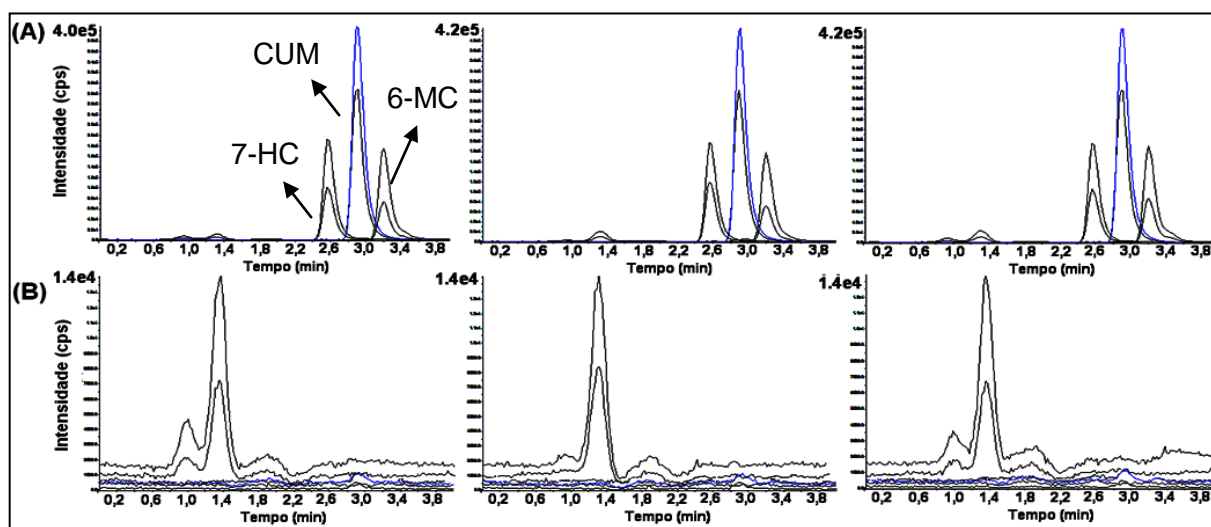


FIGURA 20: CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) ATRAVÉS DE INJEÇÕES ALTERNADAS DE (A) AMOSTRAS CONTROLE PREPARADAS NO NÍVEL MAIS ALTO DE CONCENTRAÇÃO E (B) AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO. Dados: CUM: cumarina, 7-HC: 7-hidroxycumarina, 6-MC: 6-metilcumarina

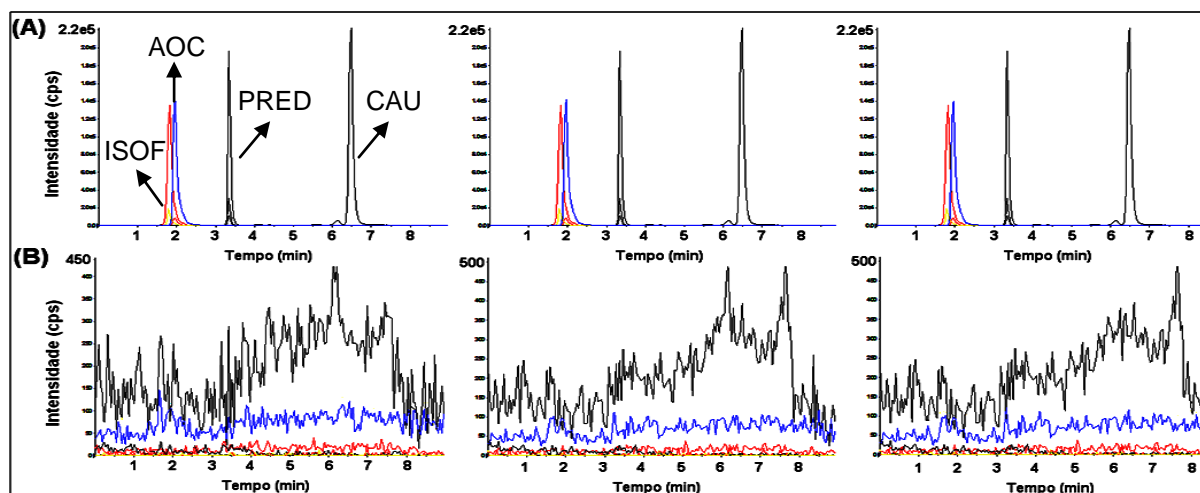


FIGURA 21: CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI-) ATRAVÉS DE INJEÇÕES ALTERNADAS DE (A) AMOSTRAS CONTROLE PREPARADAS NO NÍVEL MAIS ALTO DE CONCENTRAÇÃO E (B) AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO. Dados: ISOF: ácido isoferúlico, AOC: ácido o-cumárico, PRED: prednisona e CAU: ácido caurenóico

## 4.3.5 Precisão e exatidão

Conforme demonstrado na Tabela 14, para todos os compostos uma excelente precisão foi alcançada com valores de CV variando entre 2,72 a 10,14%. Os novos métodos também apresentaram exatidão satisfatória com valores de ER% variando entre -10,09 a 9,88%. As análises das amostras de controle de qualidade de diluição (CQD) demonstraram que os resultados obtidos com as amostras diluídas são os mesmos daqueles obtidos com amostras não diluídas. Em virtude desses resultados, os novos métodos foram considerados precisos e exatos.

TABELA 14. VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS ATRAVÉS DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS POR CLAE-EM/EM

Compostos	Amostra controle	Exatidão			Precisão	
		Concentração nominal (ng/mL)	Média Intra-dia (ER%)	Média Inter-dia (ER%)	Média intra-dia (CV%)	Média inter-dia (CV%)
Cumarina	CQ-LIQ	10,0	-10,09	-7,56	5,91	5,05
	CQB	50,0	-1,71	1,15	2,72	2,98
	CQM	500,0	-2,44	2,66	2,75	2,93
	CQA	1250,0	-7,16	-4,72	3,91	3,93
	CQD	160,0**	-1,66	-1,84	2,90	1,97
7-hidroxicumarina	CQ-LIQ	7,5	-1,03	-0,88	9,95	8,47
	CQB	12,5	9,88	2,57	4,34	6,76
	CQM	100,0	-3,82	0,92	3,50	4,37
	CQA	750,0	-1,37	-1,53	3,56	5,19
	CQD	110,0**	-1,44	0,35	3,31	4,19
6-metilcumarina*	-	500,0	5,31	0,96	3,66	6,09
Ácido o-cumárico	CQ-LIQ	10,0	0,29	-3,56	8,96	10,14
	CQB	25,0	-3,89	-0,27	5,64	4,77
	CQM	100,0	-2,56	1,02	3,99	3,86
	CQA	750,0	-1,98	-0,81	4,17	2,91
	CQD	110,0**	2,11	-0,43	3,38	4,82
Ácido caurenóico	CQ-LIQ	5,0	-8,15	-3,51	9,96	8,79
	CQB	10,0	-3,64	-3,87	4,14	6,07
	CQM	75,0	-1,60	-2,01	3,27	2,89
	CQA	500,0	2,26	1,55	4,44	3,75
	CQD	85,0**	-2,79	-2,12	2,97	3,07
Ácido isoferúlico*	-	1000,0	-0,81	1,94	2,87	3,66
Prednisona*	-	500,0	0,76	0,30	3,22	3,94

Dados: CQ-LIQ: limite inferior de quantificação; CQB: Controle de qualidade de baixa concentração; CQM: Controle de qualidade de média concentração; CQA: Controle de qualidade de alta concentração; ER%: erro relativo; CV%: coeficiente de variação; \*Padrão interno; \*\*Valor nominal após diluição de 10 vezes.



## 4.3.6 Teste de recuperação

A Tabela 15 apresenta os valores de recuperação dos analitos e padrões internos obtidos através das técnicas de extração selecionadas. Conforme demonstrado, para todos os compostos uma recuperação satisfatória (70,0 – 98,8%) foi alcançada com alta reprodutibilidade (CV < 5,0%). A extração líquido-líquido com TBME foi então considerada uma técnica adequada para extrair do plasma a cumarina, a 7-hidroxycumarina e a 6-metilcumarina (PI), enquanto que a precipitação de proteínas com acetonitrila uma técnica bastante efetiva para extrair do plasma a prednisona (PI), e os ácidos o-cumárico, caurenóico e isoferúlico (PI).

TABELA 15. RECUPERAÇÃO DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E 6-METILCUMARINA OBTIDAS ATRAVÉS EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM *TERT*-BUTIL METIL ÉTER (TBME), E RECUPERAÇÃO DA PREDNISONA E DOS ÁCIDOS O-CUMÁRICO, CAURENÓICO E ISOFERÚLICO OBTIDAS ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA

Técnica de extração	Compostos	Concentração adicionada (ng/mL)**	Quantidade recuperada (ng/mL $\pm$ DP)***	Média de recuperação (%)	Precisão da extração (CV%)
Líquido-líquido com TBME	Cumarina	57,97	55,05 $\pm$ 2,37	94,98	4,31
		582,11	560,78 $\pm$ 24,46	96,34	4,36
		1366,67	1351,11 $\pm$ 18,33	98,86	1,36
	7-hidroxycumarina	14,06	11,31 $\pm$ 0,48	80,41	4,24
		107,34	90,12 $\pm$ 2,28	83,96	2,53
		777,56	618,22 $\pm$ 18,03	80,08	2,92
	6-metilcumarina*	501,4	481,85 $\pm$ 15,91	96,05	3,31
Precipitação de proteínas	Ácido o-cumárico	25,17	19,26 $\pm$ 1,32	76,50	6,85
		100,68	71,42 $\pm$ 3,27	70,94	4,58
		755,1	530,76 $\pm$ 16,51	70,29	3,11
	Ácido caurenóico	9,95	8,97 $\pm$ 0,62	90,13	6,91
		74,63	65,73 $\pm$ 4,94	88,08	7,52
		497,5	435,61 $\pm$ 25,92	87,56	0,60
	Ácido isoferúlico*	975,73	890,64 $\pm$ 87,11	91,28	9,78
	Prednisona*	504,21	489,63 $\pm$ 17,94	97,11	3,66

\*Padrão interno; \*\*concentração real dos analitos adicionados nas amostras de plasma processadas (100%); \*\*\*quantidade dos analitos recuperada do plasma fortificado antes da extração.

## 4.3.7 Efeito matriz

Os resultados do teste do efeito matriz encontram-se dispostos na Tabela 16. Como é possível visualizar, as variações (CV%) obtidas entre os fatores de matriz normalizados (FMNs) de cada composto foram inferiores a 15% (quinze por cento), indicando que o efeito da matriz biológica na resposta dos analitos e PI é insignificante.

TABELA 16 – VARIAÇÃO DO FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO (FMN) DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO E ÁCIDO CAURENÓICO CALCULADO PARA AVALIAR O EFEITO MATRIZ (n= 8)

Compostos	Nível de concentração (ng/mL)	FMN*	Média dos FMNs $\pm$ dp	FMNs (CV%)
Cumarina	50,0	0,87 $\pm$ 0,06	0,94 $\pm$ 0,09	9,23
	1250,0	1,01 $\pm$ 0,05		
7-hidroxicumarina	12,5	1,02 $\pm$ 0,05	1,02 $\pm$ 0,04	4,18
	750,0	1,03 $\pm$ 0,03		
Ácido o-cumárico	25,0	0,95 $\pm$ 0,09	1,03 $\pm$ 0,11	10,77
	750,0	1,11 $\pm$ 0,08		
Ácido caurenóico	10,0	1,19 $\pm$ 0,10	1,10 $\pm$ 0,15	13,62
	500,0	1,00 $\pm$ 0,13		

\*FMN: Fator de matriz normalizado calculado de acordo com a equação 7

## 4.3.8 Teste de estabilidade

As Tabelas 17 e 18 resumem as diferenças entre os resultados obtidos com os analitos e os padrões internos armazenados sob diferentes condições, e os resultados obtidos com amostras preparadas a fresco. Sob as condições avaliadas, os erros de precisão (CV%) e exatidão (ER%) foram menores do que 15%, indicando que não houve diferenças significativas nas respostas após o manuseio e armazenamento das amostras. Portanto, uma excelente estabilidade foi verificada.

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 17. ESTABILIDADE DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E 6-METILCUMARINA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO (n = 8)

Estabilidade		Cumarina		7-hidroxicumarina		6-metilcumarina*
		Nível de concentração 50,0 ng/mL	Nível de concentração 1250,0 ng/mL	Nível de concentração 12,5 ng mL	Nível de concentração 750,0 ng/mL	Nível de concentração 500,0 ng/mL
8 h na bancada	Média recuperada (ng/mL ± dp)	54,5 ± 3,2	1293,1 ± 30,5	11,6 ± 0,6	757,9 ± 5,6	497,3 ± 3,8
	CV (%)	5,81	2,36	5,66	0,74	0,76
	ER (%)	8,94	3,45	-7,41	1,06	-0,54
30 dias (4 °C)	Média recuperada (ng/mL ± dp)	56,1 ± 2,3	1173,4 ± 67,9	11,4 ± 0,9	791,8 ± 60,5	480,6 ± 46,6
	CV (%)	4,04	5,78	7,59	7,64	9,69
	ER (%)	12,27	-6,13	-8,02	5,57	-3,89
Curta duração	Média recuperada (ng/mL ± dp)	52,4 ± 1,7	1205,5 ± 31,5	11,7 ± 0,6	738,1 ± 8,4	501,1 ± 1,6
	CV (%)	3,25	2,61	4,71	1,14	0,32
	ER (%)	4,81	-3,56	-6,24	-1,59	0,45
Ciclos de Descongel.	Média recuperada (ng/mL ± dp)	53,8 ± 2,7	1307,7 ± 40,7	11,6 ± 0,6	714,8 ± 24,9	NA
	CV (%)	5,01	3,11	5,56	3,48	NA
	ER (%)	7,62	4,61	-7,29	-4,69	NA
Longa duração	Média recuperada (ng/mL ± dp)	45,1 ± 3,6	1265,7 ± 99,2	11,7 ± 1,1	674,4 ± 69,7	NA
	CV (%)	7,90	7,84	9,34	10,33	NA
	ER (%)	-9,71	1,26	-6,19	-10,08	NA
Pós-preparativa	Média recuperada (ng/mL ± dp)	47,6 ± 3,4	1281,3 ± 44,2	11,5 ± 0,7	776,4 ± 18,7	468,1 ± 22,6
	CV (%)	7,09	3,45	5,93	2,40	4,66
	ER (%)	-9,55	5,00	-7,73	3,52	-6,38

NA: não aplicável; \*Padrão interno; CV: coeficiente de variação; ER: erro relativo

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 18. ESTABILIDADE DOS ÁCIDOS O-CUMÁRICO, CAURENÓICO, ISOFERÚLICO E DA PREDNISONA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO (n = 8)

Estabilidade		Ácido o-cumarico		Ácido caurenóico		Ácido isoferúlico*	Prednisona*
		Nível de concentração 25,0 ng/mL	Nível de concentração 750,0 ng/mL	Nível de concentração 10,0 ng/mL	Nível de concentração 500,0 ng/mL	Nível de concentração 1000,0 ng/mL	Nível de concentração 500,0 ng/mL
8 h na bancada	Média recuperada (ng/mL ± dp)	22,6 ± 1,3	718,0 ± 48,0	10,2 ± 0,7	516,6 ± 5,1	950,0 ± 75,2	470,5 ± 26,6
	CV (%)	7,00	3,08	6,05	2,32	3,63	4,30
	ER (%)	-9,44	-4,26	8,94	3,33	-5,00	-5,90
30 dias (4 °C)	Média recuperada (ng/mL ± dp)	22,8 ± 1,2	640,8 ± 45,6	9,75 ± 0,6	487,8 ± 34,9	1037,5 ± 68,1	497,0 ± 13,9
	CV (%)	6,59	11,09	1,76	2,32	2,60	4,30
	ER (%)	-8,89	-14,55	-2,46	3,33	3,75	-5,90
Curta duração	Média recuperada (ng/mL ± dp)	25,2 ± 0,4	750,6 ± 29,0	10,0 ± 0,3	498,9 ± 7,6	999,3 ± 62,2	502,2 ± 11,1
	CV (%)	0,56	0,05	0,16	0,15	0,04	0,31
	ER (%)	0,79	0,07	0,23	-0,22	-0,07	0,43
Ciclos de Descongel.	Média recuperada (ng/mL ± dp)	22,9 ± 1,1	729,0 ± 41,7	9,9 ± 0,4	502,5 ± 6,1	NA	NA
	CV (%)	6,14	2,00	0,29	0,35	NA	NA
	ER (%)	-8,32	-2,79	-0,41	0,49	NA	NA
Longa duração	Média recuperada (ng/mL ± dp)	22,5 ± 0,4	606,3 ± 26,8	8,8 ± 0,3	463,2 ± 12,3	NA	NA
	CV (%)	7,60	5,25	8,79	5,41	NA	NA
	ER (%)	-10,20	-7,16	-11,70	-7,36	NA	NA
Pós-preparativa	Média recuperada (ng/mL ± dp)	22,7 ± 0,6	727,4 ± 34,5	9,8 ± 0,4	509,8 ± 6,6	986,5 ± 31,7	479,3 ± 16,9
	CV (%)	1,66	2,16	1,21	1,37	0,96	2,99
	ER (%)	-2,32	-3,01	-1,70	1,96	-1,35	-4,14

NA: não aplicável; \*Padrão interno; CV: coeficiente de variação; ER: erro relativo

#### 4.4 ESTUDO FARMACOCINÉTICO DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS DO GUACO E DA 7-HIDROXICUMARINA

##### 4.4.1 Primeira triagem

As amostras de plasma coletadas no tempo zero foram utilizadas para avaliar a possível existência de níveis basais de cumarina, 7-hidroxicumarina, ácido o-cumárico e ácido caurenóico originados da dieta. Nenhuma das amostras do tempo zero apresentou níveis detectáveis dessas substâncias nas triagens avaliadas.

No plasma dos voluntários que receberam 60 mL do xarope de guaco (17,6 mg de cumarina, 1,1 mg de ácido o-cumárico e 8,9 mg de ácido caurenóico), não foi detectada a presença de nenhuma das substâncias analisadas até 600 min após a administração do fitoterápico. Importante ressaltar que os métodos bioanalíticos desenvolvidos e aplicados nesse estudo apresentaram uma alta sensibilidade (detecção  $\leq 3,0$  ng/mL), o que demonstra que os níveis plasmáticos dos principais metabólitos do guaco e da 7-hidroxicumarina são extremamente baixos. Esse resultado sugere uma baixa biodisponibilidade dessas substâncias mesmo utilizando uma dose de xarope 12 vezes maior que a recomendada nas bulas (5,0 mL). Assim, conclui-se que a administração do xarope de guaco na dose recomendada não proporciona níveis plasmáticos suficientes dessas substâncias para que, pelo menos isoladas, possam promover o efeito broncodilatador esperado.

##### 4.4.2 Segunda triagem

Em virtude dos baixos níveis plasmáticos obtidos com a administração do xarope na triagem anterior, o estudo cinético dos principais metabólitos do guaco só seria possível se o fitoterápico fosse fortificado com quantidades conhecidas dessas substâncias. No entanto, a toxicidade do ácido o-cumárico ainda é desconhecida, e alguns estudos apontam que o ácido caurenóico pode ser tóxico, fato que inviabilizaria a fortificação do xarope com essas substâncias. Fortificar o xarope de guaco com 7-hidroxicumarina também não faria sentido, pois a 7-hidroxicumarina

---

não faz parte da composição química do guaco. A 7-hidroxycumarina é oriunda do metabolismo hepático da cumarina (RITSCHER *et al.*, 1977).

A cumarina por sua vez é relatada como substância de baixo potencial tóxico e seu uso em humanos é reportado de longa data (THORNES *et al.*, 1982, 1989). Essa substância também é considerada o principal metabólito do guaco, e dessa forma fortificar o xarope com cumarina seria bastante apropriado para avaliar seu perfil farmacocinético. Porém não há um consenso quanto a dose recomendada de cumarina para realização de um estudo farmacocinético e, o que se sabe, é que a quantidade ingerida dessa substância pode variar consideravelmente de acordo com a terapia ou tipo de estudo (30 a 3000 mg, por exemplo) (RITSCHER *et al.*, 1977; THORNES; LYNCH; SHEEHAN, 1982; RITSCHER; ALCORN; RITSCHER, 1984; LACY; O'KENNEDY, 2004).

Sendo assim, avaliar a resposta plasmática da cumarina mediante diferentes doses desse ativo se tornou indispensável antes da condução do estudo farmacocinético. Além disso, foi imprescindível considerar a relação entre a dose administrada de cumarina e os efeitos broncodilatadores que essa substância promoveu em porquinhos-da-índia ( $AD_{50}$ : 75 mg/kg) (RAMANITRAHASIMBOLA *et al.*, 2005). Por extrapolação alométrica foi calculada a dose para obtenção do efeito broncodilatador em humanos, que resultou em 21 mg/kg (WEST; BROWN, 2005; WHITE; SEYMOUR, 2005). Sendo assim, para um homem de 70 kg a quantidade ideal de cumarina para fortificação do xarope seria de 1470,0 mg.

Embora a maioria dos estudos indique que a toxicidade da cumarina para humanos seja potencialmente baixa, é recomendado considerar a possibilidade do aparecimento de efeitos tóxicos durante a condução do estudo. Dessa forma, selecionamos quantidades progressivas de cumarina para fortificar o xarope de guaco, com o intuito de avaliar a resposta plasmática mediante diferentes doses, e também de verificar se o estudo farmacocinético seria viável com uma dose menor que a extrapolada alometricamente (1470,0 mg).

A triagem com diferentes doses de cumarina contou com a participação de quatro voluntários que receberam, separadamente, uma dose única de 60 mL de xarope de guaco fortificado com 100, 500, 1000 ou 1500 mg de cumarina. O estudo demonstrou que a cumarina é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, pois níveis consideráveis dessa substância foram encontrados no plasma dos voluntários logo após 10 min da administração do xarope (Figura 22A).

---

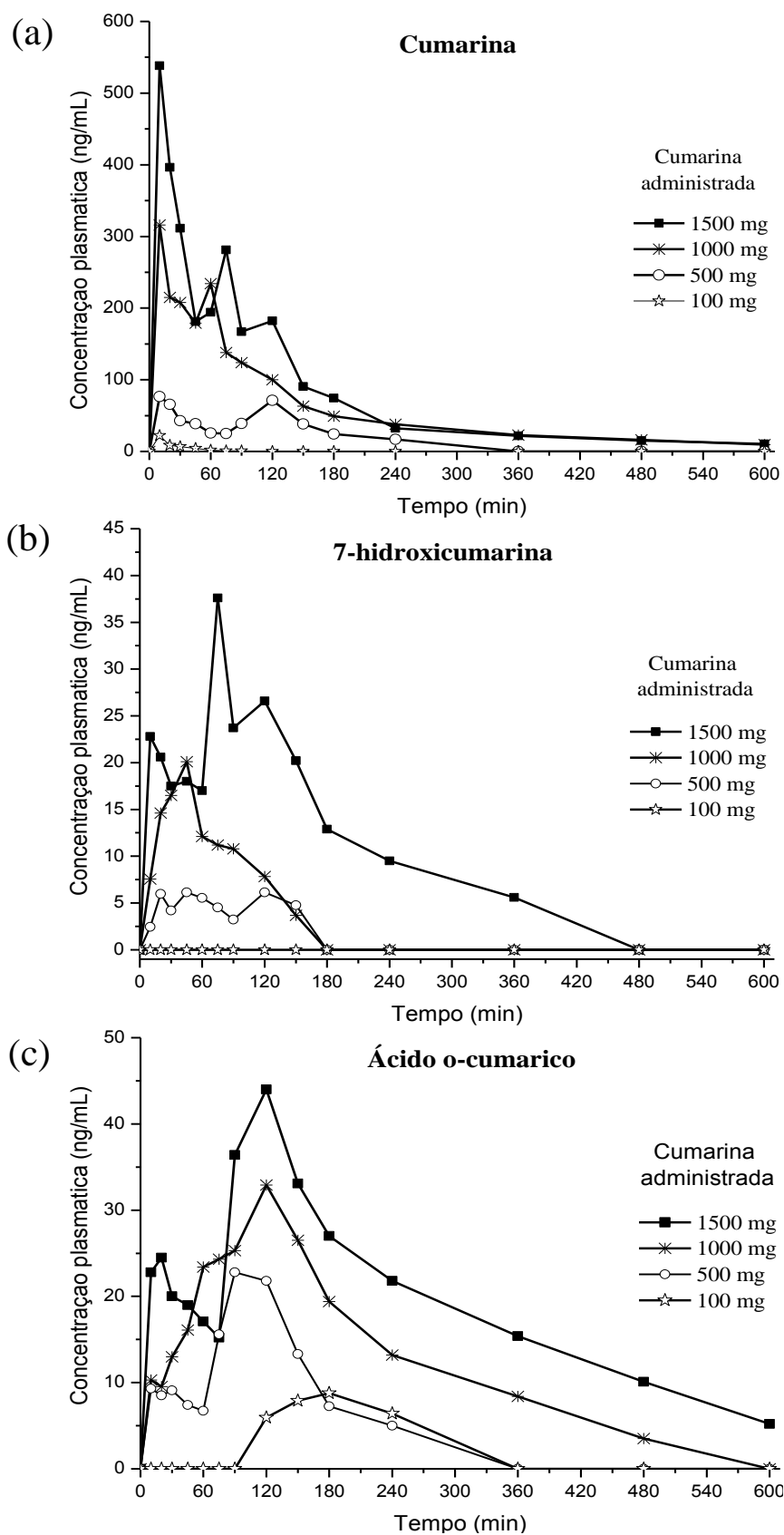


FIGURA 22 – PERFIL TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DA (A) CUMARINA, (B) 7-HIDROXICUMARINA E (C) ÁCIDO O-CUMÁRICO OBTIDOS COM VOLUNTÁRIOS HUMANOS QUE RECEBERAM 60 ML DE XAROPE DE GUACO FORTIFICADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CUMARINA

A rápida absorção da cumarina é justificada pelo seu elevado coeficiente de partição e também pela sua natureza química pouco polar (Quadro 1). Essas características sugerem que o transporte da cumarina pelos enterócitos ocorra por difusão passiva, fato que favorece não só a rápida, mas a completa absorção da cumarina pela membrana intestinal (LACY; O'KENNEDY, 2004).

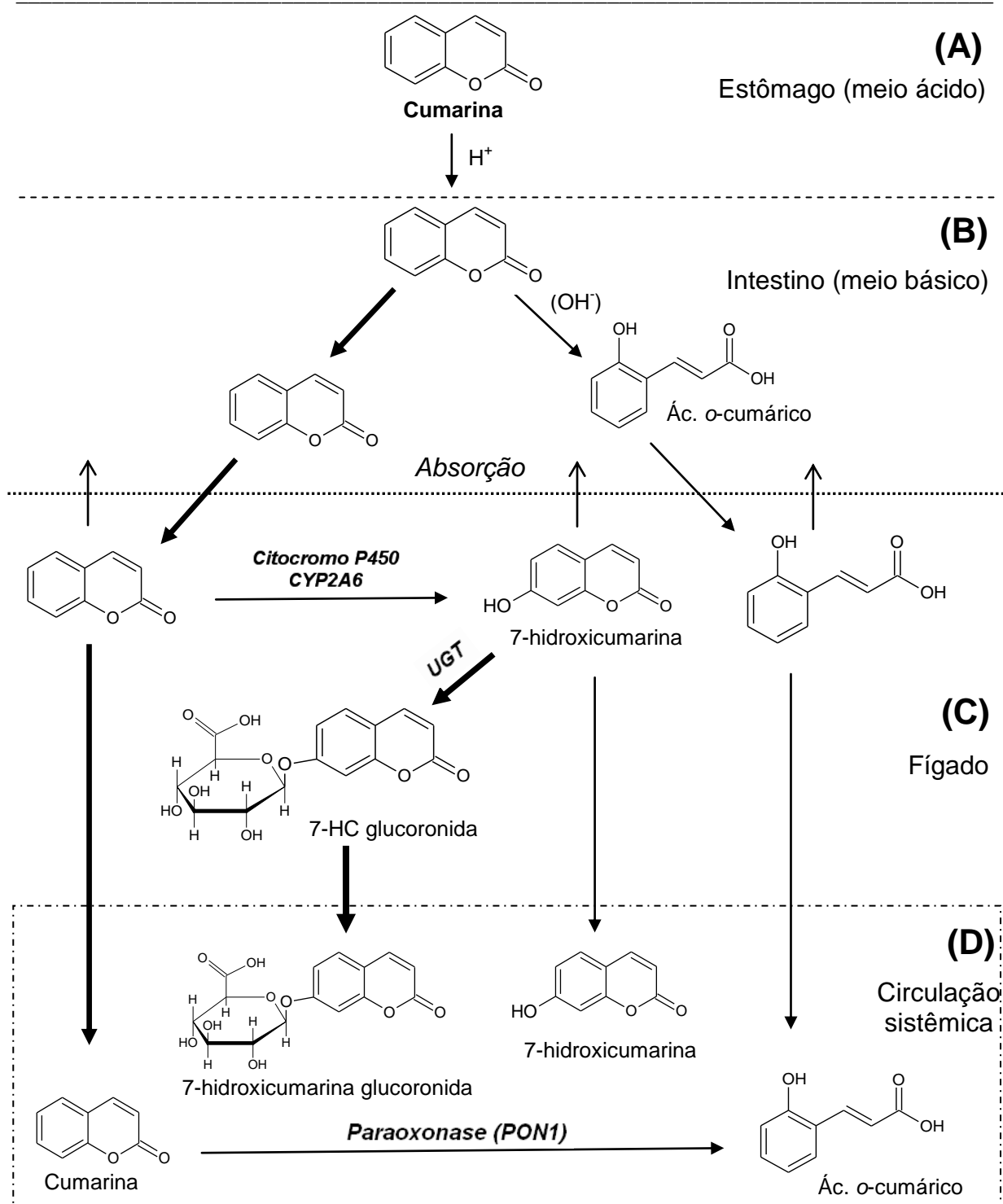
Após o pico de absorção (10 min), um rápido declínio na concentração plasmática da cumarina foi notado, fato que sugere uma imediata distribuição dessa substância no organismo (Figura 22A). Picos de concentração plasmática foram observados entre 45 e 120 min da administração do xarope, com um período de eliminação claramente evidenciado após o período de 180 min.

Na dose de 100 mg, níveis quantificáveis de cumarina foram determinados apenas nos tempos 10 e 20 min após a administração do xarope. Nos demais períodos apenas traços ou nenhuma cumarina foi detectada no plasma do voluntário (Figura 22A). As doses de 500 e 1000 mg demonstraram-se ideais para determinar os parâmetros farmacocinéticos da cumarina. No entanto, com essas doses não foi possível obter quantidade suficiente de 7-hidroxycumarina convertida para construção de um perfil cinético adequado desse metabólito (Figura 22B).

Por meio da administração de 1500 mg de cumarina um perfil cinético adequado da 7-hidroxycumarina foi alcançado. Níveis notórios, e por hora inesperados de ácido o-cumárico também foram observados no plasma do voluntário que recebeu a dose de 1500 mg de cumarina (Figura 22C). Os altos níveis de ácido o-cumárico encontrados no plasma do voluntário indicam que além da via da 7-hidroxilação (considerada majoritária), a hidrólise do anel lactona formando o composto carboxilado é uma das possíveis rotas de metabolismo da cumarina.

A hidrólise do anel lactona pode, de fato, ocorrer quimicamente ainda na região intestinal, onde o meio básico proporciona condições favoráveis para esse tipo de reação (BOOTH *et al.*, 1959; DEWICK, 2004). A hidrólise da cumarina também pode ocorrer enzimaticamente através da enzima paraoxonase (PON1) que está presente no sangue humano. A paraoxonase é considerada uma importante catalisadora da hidrólise de lactonas, especialmente as que contêm em sua estrutura química anéis de quatro a sete átomos (BILLECKE *et al.*, 2000). A ocorrência simultânea da hidrólise química (intestino) e enzimática (enzima PON1) da cumarina também não pode ser descartada. A rota proposta de metabolismo da cumarina via 7-hidroxilação e via hidrólise do anel lactona é apresentada na Figura 23.





**FIGURA 23 – METABOLISMO DA CUMARINA EM HUMANOS VIA 7-HIDROXILAÇÃO E POSSÍVEIS ROTAS DE METABOLISMO DA CUMARINA VIA HIDRÓLISE DO ANEL LACTONA.** (A) No estômago (pH: 1-2) a cumarina ingerida permanece intacta. (B) Ao atingir o intestino (pH: 7-9) uma fração da cumarina é hidrolisada em ácido o-cumárico e a outra fração permanece intacta. (C) A cumarina e o ácido o-cumárico convertido são absorvidos pela mucosa intestinal e atingem o fígado. Parte da cumarina e do ácido o-cumárico atingem a circulação sistêmica. A fração de cumarina que permaneceu no fígado sofre metabolismo de fase I através citocromo CYP2A6, transformando-se em 7-hidroxycumarina. Uma parte da 7-hidroxycumarina convertida atinge a circulação sistêmica, e a outra parte sofre metabolismo sequencial através da enzima UDP-glucuronosiltransferase (UGT), transformando-se em 7-hidroxycumarina glucoronida. (D) Na circulação sistêmica, a cumarina sofre hidrólise enzimática através da enzima paraoxonase (PON1) convertendo-se em ácido o-cumárico. Nota:  $\longrightarrow$  Via preferencial;  $\longrightarrow$  Via secundária;  $\longrightarrow$  Possibilidade de circulação entero-hepática

Outro ponto importante e claramente evidenciado nos gráficos de concentração plasmática pelo tempo foi a existência de uma relação direta entre a quantidade de cumarina presente no plasma dos voluntários e a quantidade de ácido *o*-cumárico e 7-hidroxycumarina determinados nesse plasma (Figura 22). Em suma, se existir qualquer efeito biológico por parte do ácido *o*-cumárico e da 7-hidroxycumarina, este será dependente da dose de cumarina.

#### 4.4.3 Estudo farmacocinético da cumarina e de seus metabólitos 7-hidroxycumarina e ácido *o*-cumárico

Mediante os resultados obtidos na segunda triagem, o estudo farmacocinético da cumarina e de seus metabólitos (7-hidroxycumarina e ácido *o*-cumárico) foi realizado a partir da condução de um terceiro estudo que contou com a participação de cinco voluntários que receberam 60 mL de xarope de guaco fortificado com 1500 mg de cumarina (dose extrapolada alometricamente). Com essa dose o perfil das concentrações plasmáticas pelo tempo de cada substância pôde ser construído, e por consequência, os parâmetros farmacocinéticos foram determinados (Tabela 19).

Conforme demonstrado na Figura 24, o perfil da concentração plasmática pelo tempo de cada substância exibiu três picos. A cumarina e o ácido *o*-cumárico apresentaram picos de concentração nos tempos de 10, 45 e 90 min enquanto que a 7-hidroxycumarina nos tempos 45, 75 e 120 min. Esses resultados sugerem a possibilidade de circulação entero-hepática tanto para a cumarina como para seus metabólitos.

A ocorrência de circulação entero-hepática obtida em nosso estudo é uma proposta contraditória à descrita por Shilling e colaboradores (1969), os quais alegam que a possibilidade de excreção biliar da cumarina e seus metabólitos é muito pequena devido ao amplo metabolismo e a rápida eliminação dessas substâncias pelo organismo. Porém, o fato de os gráficos demonstrarem possibilidade de circulação entero-hepática pode estar associado à dose de cumarina, que em nosso estudo foi de 1500 mg e no caso de Shilling e colaboradores (1969) de apenas 200 mg. Com uma dose maior é muito provável que ocorra saturação do órgão eliminador, e dessa forma, a parte da cumarina ou

---

metabólito que não atingir a circulação sistêmica passa a ser excretada via ducto biliar, retornando ao intestino, onde sofre reabsorção pela membrana intestinal (Figura 25).

A saturação do citocromo (CYP2A6) e da enzima paraoxonase (PON1) também justifica o platô demonstrado na curva cinética de cada substância (Figura 24). O que fica evidente é que os níveis de concentração plasmática são mantidos enquanto há saturação dos mecanismos de metabolização, e na medida em que a saturação chega ao fim, a fase de eliminação se torna o processo principal.

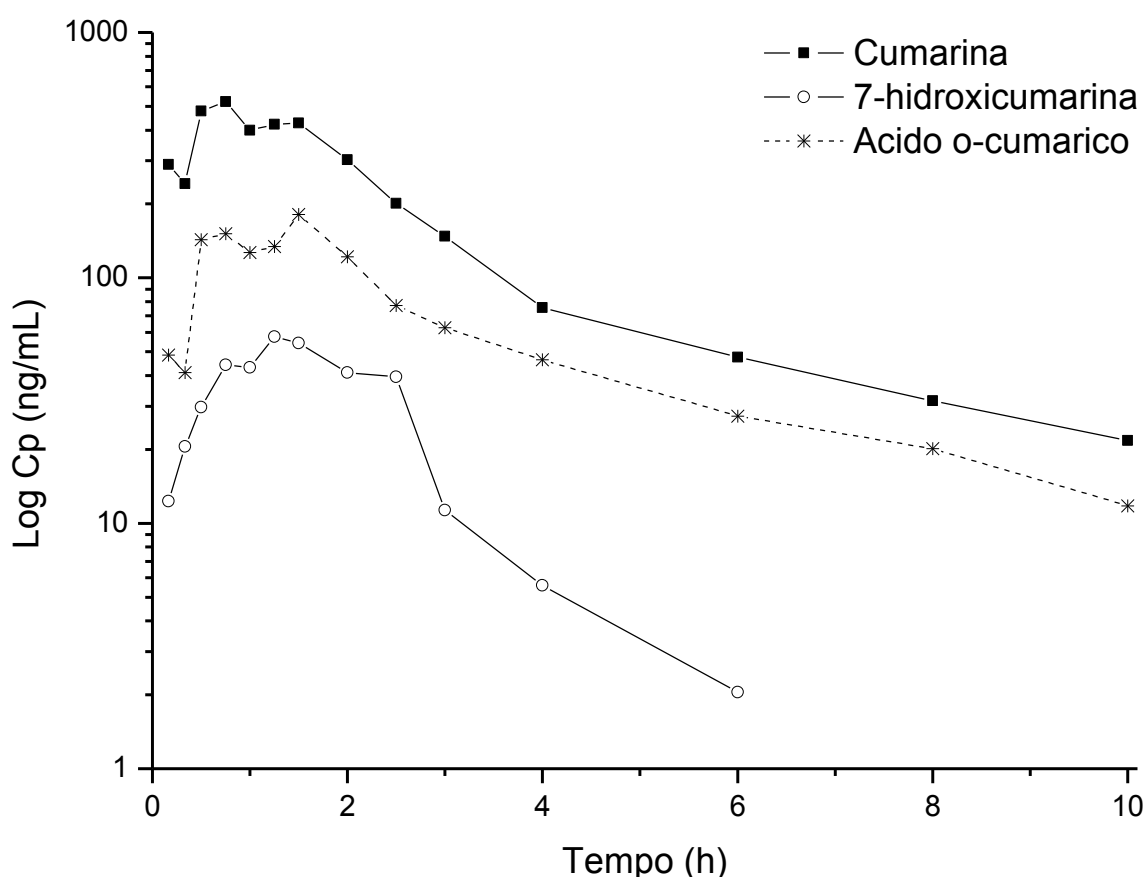


FIGURA 24 – PERFIL TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA MÉDIA DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E ÁCIDO O-CUMÁRICO. Dados: Os resultados foram obtidos com voluntários humanos que receberam 60 ml de xarope de guaco fortificado com 1500 mg de cumarina (n=5)

Os gráficos temporais também demonstraram que existem diferenças significativas de biodisponibilidade entre a cumarina, o ácido o-cumárico e a 7-hidroxycumarina (Figura 24). Durante todo perfil temporal da 7-hidroxycumarina é possível visualizar que a quantidade desse metabólito no plasma é aproximadamente 10 vezes menor que a da cumarina, dado este confirmado através

do cálculo dos parâmetros farmacocinéticos que demonstraram uma área sob a curva ( $ASC_{0-t}$ ) de 1341,0 ng\*h/mL para cumarina e 126,0 ng\*h/mL para 7-hidroxicumarina (Tabela 19). O ácido o-cumárico apresentou uma  $ASC_{0-t}$  de 465,0 ng\*h/mL, área aproximadamente três vezes maior que a da 7-hidroxicumarina. Este inédito resultado demonstra que o ácido o-cumárico, mais do que a 7-hidroxicumarina, é um dos principais metabólitos biodisponíveis da cumarina, e, portanto seus efeitos tóxicos ou terapêuticos em humanos devem ser avaliados.

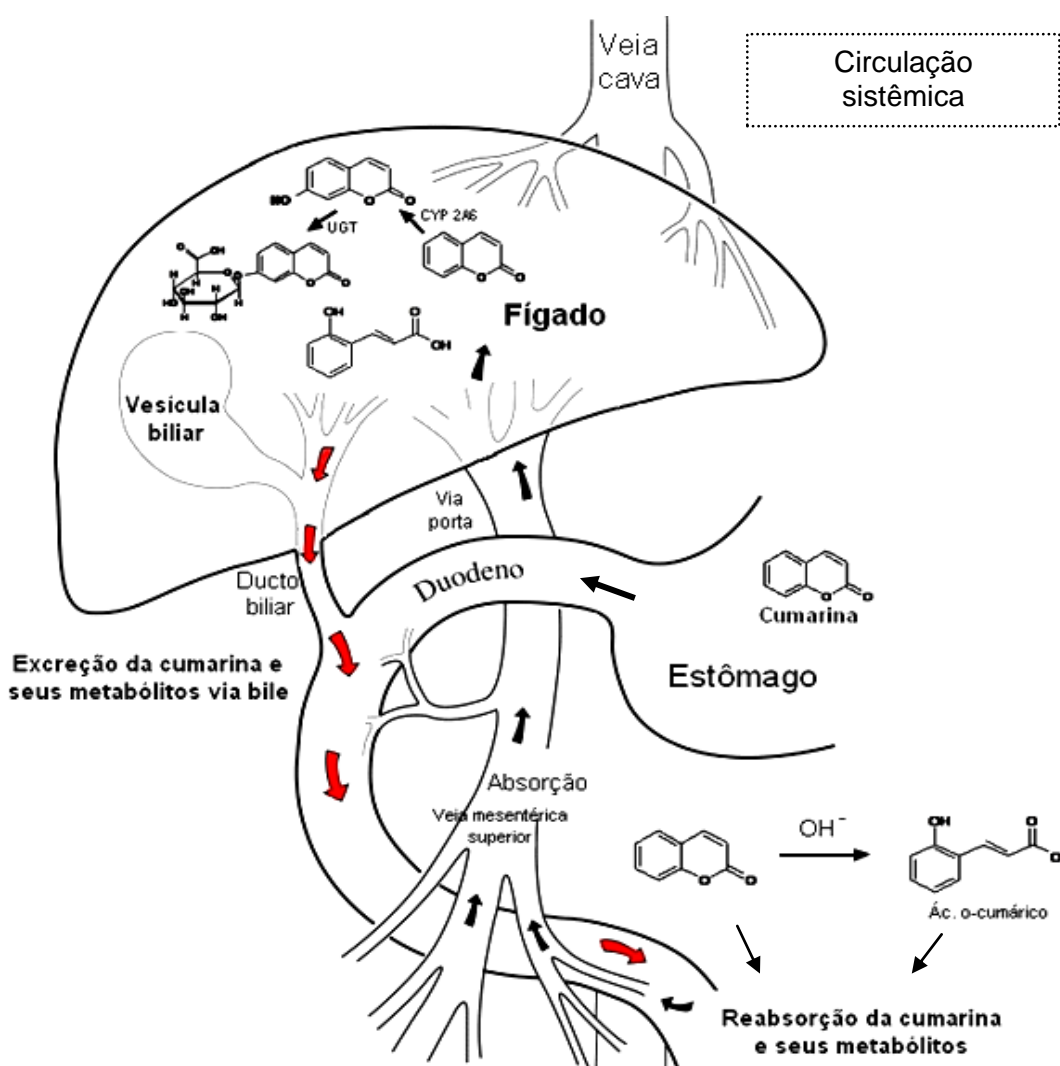


FIGURA 25 – ESQUEMA REPRESENTANDO A CIRCULAÇÃO ENTERO-HEPÁTICA DA CUMARINA E SEUS METABÓLITOS. Nota: Ao atingir as regiões mais próximas do intestino parte da cumarina administrada é rapidamente absorvida. Ao atingir as regiões mais distantes do intestino (pH: 7-9) uma fração da cumarina é hidrolisada em ácido o-cumárico e a outra fração permanece intacta. A cumarina que não foi hidrolisada e o ácido o-cumárico convertido da cumarina são absorvidos pela mucosa intestinal e atingem o fígado. No fígado parte da cumarina absorvida sofre metabolismo de fase I através do citocromo CYP2A6, transformando-se em 7-hidroxicumarina. A 7-hidroxicumarina sofre metabolismo sequencial através da enzima UDP-glucuronosiltransferase (UGT), sendo biotransformada em 7-hidroxicumarina glucoronida. A parte da cumarina e seus metabólitos que não atingem a circulação sistêmica são excretados via ducto biliar, onde novamente atingem o intestino e são reabsorvidos.

TABELA 19. RESULTADO DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DA CUMARINA, 7-HIDROXICUMARINA E ÁCIDO O-CUMÁRICO OBTIDOS EM PLASMA HUMANO APÓS A ADMINISTRAÇÃO ORAL DE 60 mL DE XAROPE DE GUACO FORTIFICADO COM 1500 mg DE CUMARINA (n=5)

Parâmetros calculados	Cumarina (Média ± DP)	7-Hidroxicumarina (Média ± DP)	Ácido o-cumárico (Média ± DP)
$C_{max}$ (ng/mL)	735, 46 ± 252,29	84,98 ± 40,15	230,64 ± 186,98
$T_{max}$ (h)	0,93 ± 0,57	1,40 ± 0,68	1,45 ± 0,84
$ASC_{0-t}$ (ng*h/mL)	1341,0 ± 515,0	126,0 ± 54,0 <sup>a</sup>	465,0 ± 299,0 <sup>a,b</sup>
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h/mL)	1458,0 ± 547,0	134,0 ± 58,0 <sup>a</sup>	518,0 ± 299,0 <sup>a,b</sup>
r áreas	0,92 ± 0,03	0,95 ± 0,05	0,87 ± 0,08
$T_{1/2}$ (h)	4,01 ± 0,85	1,16 ± 0,82 <sup>a</sup>	3,50 ± 0,83 <sup>b</sup>
$K_{el}$ (1/h)	0,18 ± 0,04	0,91 ± 0,69 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,06 <sup>b</sup>
Vd/f (L)	6733,0 ± 3284,0	-	-
Cl/f (L/h)	1148,0 ± 411,0	-	-

$C_{max}$ : concentração máxima em plasma observada;  $T_{max}$ : Tempo em que a concentração máxima foi observada no plasma;  $ASC_{0-t}$ : área sob a curva do tempo zero até o tempo da última coleta;  $ASC_{0-\infty}$ : área sob a curva de concentração plasmática extrapolada ao infinito;  $T_{1/2}$ : tempo necessário para que a concentração plasmática decline à metade; Vd/f: volume de distribuição aparente; Cl/f: *clearance* aparente; DP: desvio padrão. <sup>a</sup>Diferença estatística em relação a cumarina (teste *t* pareado); <sup>b</sup>Diferença estatística em relação a 7-hidroxicumarina (teste *t* pareado).

A comparação estatística (teste *t* pareado) do parâmetro constante de eliminação ( $K_{el}$ ) demonstrou que a eliminação da 7-hidroxicumarina é mais rápida do que a do seu precursor, a cumarina (Tabela 19). Já a constante de eliminação do ácido o-cumárico não apresentou diferença estatística significativa da constante de eliminação da cumarina (Tabela 19).

O fato da constante de eliminação do ácido o-cumárico ( $K_{el}$ = 0,21) ser graficamente igual a constante de eliminação da cumarina ( $K_{el}$ = 0,18) não reflete a real velocidade de eliminação desse metabólito. Para o ácido o-cumárico o que se espera é uma constante de eliminação maior do que o valor calculado, pois quimicamente essa substância é mais polar do que a cumarina, fato que favorece sua rápida eliminação. Além disso, quando a constante de eliminação do metabólito é superior à do fármaco, graficamente a inclinação da reta terminal da curva do metabólito é semelhante a do fármaco, mas a área sob a curva é inferior pois, à

medida em que o metabólito é formado, sua excreção ocorre prontamente, o que dificulta sua acumulação (HOUSTON, 1982). Esta é a situação observada para o metabólito ácido o-cumárico o que sugere que a sua eliminação é limitada pela sua taxa de formação. A valor real da constante de eliminação do ácido o-cumárico só será conhecida quando essa substância for administrada em humanos.

Em relação à constante de eliminação da 7-hidroxicumarina, esta foi graficamente maior do que a constante de eliminação da cumarina. Isto não é uma situação comum para um metabólito, pois simplesmente é impossível que o metabólito seja eliminado mais rapidamente do que é formado. Assim, a meia vida do metabolito pode ser igual ou maior que a meia vida do seu precursor, o que significa que a constante de eliminação do metabólito só pode ser graficamente, igual ou menor que a do fármaco precursor (HOUSTON, 1982).

Em certas situações, é possível que o metabólito formado sofra metabolismo sequencial no tecido hepático antes de alcançar a circulação sistêmica (HOUSTON, 1982). Esse é o caso da 7-hidroxicumarina, onde Ritschel e colaboradores (1977) demonstraram que essa substância sofre no fígado significativo efeito de primeira passagem, convertendo-se ao seu metabólito glucorinado (7-hidroxicumarina glucorinada). O efeito de primeira passagem da 7-hidroxicumarina pode explicar porque a área sob a curva dessa substância é tão menor que a dos outros dois compostos analisados, e porque a inclinação da reta terminal da curva de concentração plasmática conduz a um valor de  $K_{el}$  tão elevado. Resumidamente, a quantidade de 7-hidroxicumarina convertida a partir da cumarina pode até ser elevada no tecido hepático, mas nem toda 7-hidroxicumarina alcança a circulação sistêmica devido ao seu metabolismo sequencial.

O cálculo dos parâmetros farmacocinéticos (Tabela 19) demonstrou que o valor médio do *clearance* aparente ( $Cl/f$ ) da cumarina é de 1148 L/h. No trabalho desenvolvido por Ritschel e colaboradores (1977) os autores calcularam que a biodisponibilidade oral da cumarina é de 0,034 (3,4%). Utilizando este valor para estimar o  $Cl$  obtido no presente estudo, recalcula-se:

$$Cl = 1148 \text{ L/h} \times 0,034 = 39,03 \text{ L/h} \quad (\text{Equação 8})$$

Basicamente dois fatores fisiológicos interferem significativamente na capacidade de Cl: a perfusão sanguínea do órgão eliminador e a capacidade intrínseca deste órgão para efetivar a eliminação do fármaco. A perfusão sanguínea está intimamente ligada ao débito cardíaco - quantidade de sangue bombeada pelo coração em litros/minuto – que se expressa pela relação entre o volume sistólico e frequência cardíaca.

O débito cardíaco pode ser o fator limitante ao Cl e em condições fisiológicas ideais de eliminação o valor numérico máximo de Cl será aproximadamente o valor do débito cardíaco. O cálculo do débito cardíaco (DC) pode ser realizado através da equação:

$$DC \text{ (mL/min.Kg)} = 180 \times \text{massa corporal}^{-0,19} \quad (\text{Equação 9})$$

Para um homem adulto de 70 kg, calcula-se o DC:

$$DC \text{ (mL/min.Kg)} = 180 \times 70^{-0,19}, \text{ logo } DC \text{ (mL/min.Kg)} = 80,3$$

A interpretação fisiológica do valor numérico de *clearance* deve considerar como referência o sistema biológico em questão, uma vez que o fluxo sanguíneo local e a taxa de extração do fármaco naquele órgão é essencialmente uma característica anatômica e funcional de cada organismo. Porém, se considerarmos que 50% do fluxo sanguíneo em humanos é destinado ao tecido hepático e renal, pode-se dizer que o Cl máximo para um homem adulto é de 40 mL/min.Kg, e então para 70 kg o valor seria 168 L/h (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a). Assim, o Cl obtido para a cumarina (39,03 L/h) no presente estudo corresponde a aproximadamente 23,2% da capacidade total de depuração (depuração renal+hepática+biliar e outros) para um homem de 70 kg. O Cl da cumarina obtido em nosso estudo (39,03 L/h) foi considerado alto quando comparado com o Cl da teofilina (2,8 L/h), um medicamento de referência utilizado para o tratamento da asma (ROVEI; CHANOINE; BENEDETTIF, 1982).

---

O cálculo dos parâmetros farmacocinéticos também demonstrou que o valor médio do volume aparente de distribuição ( $V_d/f$ ) da cumarina foi de 6733,0 L e, novamente considerando o trabalho publicado por Ritschel e colaboradores (1977) estima-se o valor de  $V_d$  para o presente estudo:

$$V_d = 6733,0 \text{ L} \times 0,034 = 228,9 \text{ Litros} \quad (\text{Equação 10})$$

É importante ressaltar que através do  $VD$  não é possível determinar os sítios anatômicos da localização do fármaco, que somente podem ser determinados por análises diretas das suas concentrações nos tecidos. Porém, se considerarmos que um homem de 70 kg possui um volume total aproximado de 42 a 43 L de líquido corporal (LABAUNE, 1993), um valor de  $VD$  de 228,9 L indica que a cumarina é amplamente distribuída no organismo. Como comparativo, o  $VD$  da cumarina (228,9 L) em nosso estudo foi muito superior ao do medicamento de referência teofilina (35,0 L) (ROVEI; CHANOINE; BENEDETTIF, 1982).

O estudo farmacocinético também demonstrou que a meia vida de eliminação ( $T_{1/2}$ ) da cumarina é relativamente curta (aproximadamente 4 h). A meia vida de eliminação de um fármaco nada mais é do que um parâmetro híbrido do  $CL$  e do  $V_d$ , que representa o tempo necessário para que a concentração plasmática de uma determinada substância decline para a metade. Quando o  $CL$  é elevado, há uma tendência de curta meia vida de eliminação, por outro lado, quando o  $V_d$  é elevado, a meia vida de eliminação tende a ser longa ( $T_{1/2} = 0,632 \times V_d/CL$ ) (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004b). Em nosso estudo o  $V_d$  da cumarina foi bastante elevado, porém observa-se que a capacidade de depuração do organismo ( $CL$ ) teve impacto direto sobre a curta meia vida dessa substância.

Outro ponto que merece ser ressaltado é a concentração máxima da cumarina ( $C_{max}$ : 735 ng/mL) observada no plasma dos voluntários que receberam uma dose oral de 1500 mg da substância. A dose de 1500 mg de cumarina é equivalente a dose extrapolada alometricamente para humanos para que o efeito broncodilatador seja alcançado. Se considerarmos que a cumarina apresenta uma baixa biodisponibilidade oral, e que sua dose diária não deve exceder 5 mg (0,33% da dose testada), é de se esperar que a administração do xarope de guaco sob o

---



regime posológico estabelecido proporcione concentrações plasmáticas de cumarina significativamente inferiores àquelas que promoveram efeito broncodilatador. Portanto, não há expectativa de ocorrência de efeito para a cumarina isoladamente.

A mesma ênfase deve ser dada ao ácido caurenóico, o qual promoveu efeito vasodilatador em aorta de ratos em concentrações superiores a 10  $\mu$ M (TIRAPELLI *et al.*, 2002; TIRAPELLI *et al.*, 2004). Com a administração de 60 mL do xarope de guaco (8,9 mg do ativo) o ácido caurenóico não foi detectado no plasma dos voluntários, portanto, é pouco provável que administrando a dose recomendada (5 mL, três vezes/dia) sejam obtidos níveis plasmáticos significativos dessa substância para que qualquer efeito terapêutico seja alcançado.

No que diz respeito aos efeitos broncodilatadores da 7-hidroxicumarina, estes foram observados em camundongos que receberam uma dose oral do ativo de 60 mg/kg (BOGAN; O'KENNEDY, 1996; VASCONCELOS *et al.*, 2009). Uma dose de 60 mg/kg equivale a uma dose alométrica de 600 mg de 7-hidroxicumarina em um indivíduo de 70 kg. Mediante essa explanação é possível concluir que, administrando xarope de guaco, não há qualquer possibilidade de se obter níveis suficientes de 7-hidroxicumarina convertida para que um efeito broncodilatador seja alcançado.

Cabe mencionar que, em se tratando de um fitoterápico, não se descarta a possibilidade de um efeito sinérgico entre os seus principais metabólitos, e por isso estudos devem ser conduzidos para avaliar esse possível efeito. Mais do que isso, a eficácia do xarope de guaco só será conhecida quando estudos clínicos e direcionados a humanos forem por fim conduzidos. Só assim será possível o desenvolvimento de preparações eficazes e seguras, ou quem sabe impedir que recursos públicos sejam alocados para compra de medicamentos que não trazem nenhum benefício à população.

---

---

## ***5. CONCLUSÃO***

---

---

## CONCLUSÃO

---

- Os métodos por CLAE-EM/EM desenvolvidos nesse estudo apresentaram-se adequados para quantificação da cumarina, 7-hidroxicumarina, ácido o-cumárico e ácido caurenóico em plasma humano. Os parâmetros de validação indicaram que os métodos são sensíveis, seletivos, lineares, precisos, exatos e livres de efeito da matriz. Todos os compostos apresentaram uma excelente estabilidade tanto em solução quanto em matriz biológica;
  - A administração de 60 ml de xarope de guaco, em dose única, demonstrou que a biodisponibilidade oral dos compostos analisados é insuficiente para atingir níveis plasmáticos detectáveis pelos métodos bioanalíticos validados;
  - A administração de 60 ml de xarope de guaco fortificado com 1500 mg de cumarina resultou em níveis plasmáticos significativos de cumarina, 7-hidroxicumarina e ácido o-cumárico, o que permitiu verificar que a eliminação do ácido o-cumárico é dependente da sua taxa de formação, e ainda que o ácido o-cumárico é um dos principais metabolitos biodisponíveis da cumarina;
  - Os níveis plasmáticos de 7-hidroxicumarina foram extremamente baixos e o seu perfil farmacocinético sugere significativo metabolismo sequencial hepático com baixo acesso à circulação sistêmica;
  - O estudo farmacocinético conduzido com voluntários que receberam 60 ml de xarope de guaco fortificado com 1500 mg de cumarina demonstrou que a biodisponibilidade da cumarina é baixa, e que a quantidade convertida de seus principais metabólitos (ácido o-cumárico e 7-hidroxicumarina) é dependente da sua dose;
  - A administração do xarope de guaco na posologia atualmente recomendada não proporciona níveis plasmáticos suficientes dos principais metabólitos do guaco para que isoladamente possam promover o efeito broncodilatador;
-

## **CONCLUSÃO**

---

- Estudos avaliando um possível efeito sinérgico entre a cumarina, a 7-hidroxycumarina, o ácido o-cumárico e o ácido caurenóico devem ser realizados para que o real mecanismo de ação do guaco seja compreendido;
  - Estudos clínicos para avaliar a efetividade do xarope de guaco devem ser conduzidos, pois o uso desse fitoterápico tem impacto financeiro na saúde pública.
-

---

## **6. REFERÊNCIAS**

---

---

Abraham, K.; Pfister, M.; Wohrlin, F.; Lampen, A. Relative bioavailability of coumarin from cinnamon and cinnamon-containing foods compared to isolated coumarin: a four-way crossover study in human volunteers. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 4, p.644-653, 2011.

Alice, C. B.; Siqueira, N. C. S.; Mentz, L. A.; Silva, G. A. A. B.; José, K. F. D. **Plantas Medicinais de Uso Popular. Atlas farmacognóstico**. Canoas: Ulbra, 1995.

Alves, C. F.; Alves, V. B. F.; de Assis, I. P.; Clemente-Napimoga, J. T.; Uber-Bucek, E.; Dal-Secco, D.; Cunha, F. Q.; Rehder, V. L. G.; Napimoga, M. H. Anti-inflammatory activity and possible mechanism of extract from *Mikania laevigata* in carrageenan-induced peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 8, p. 1097-1104, 2009.

Angely, J. **Flora analítica do Paraná**. São Paulo: Phytón, 1965.

Bighetti, A. E. **Atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico e da cumarina isolada da Mikania laevigata Schultz Bip**. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

Bighetti, A. E.; Antonio, M. A.; Kohn, L. K.; Rehder, V. L.; Foglio, M. A.; Possenti, A.; Vilela, L.; Carvalho, J. E. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**, v. 12, n. 1, p. 72-77, 2005.

Billecke, S.; Draganov, D.; Counsell, R.; Stetson, P.; Watson, C.; Hsu, C.; La Du, B. N. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 28, n. 11, p.1335 - 1342, 2000.

Blahová, E.; Brandsteterová, E. Approaches in sample handling before HPLC analysis of complex matrices. **Chemical Papers**, v. 58, n. 5, p. 362-373, 2004.

Bogan, D. P.; O'kenedy, R. Simultaneous determination of coumarin, 7-hydroxycoumarin and 7-hydroxycoumarin glucuronide in human serum and plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 686, n. 2, p. 267-273, 1996.

Booth, A. N.; Masri, M. S.; Robbins, D. J.; Jones, E. F. T.; Deeds, F. Urinary metabolites of coumarin and o-coumaric acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 234, n. 4, p.946-948, 1959.

Botsaris, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, n. 1, p. 18, 2007.

BRASIL. **Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. 1ª ed. São Paulo: Nacional, 1929.

Brasil. **Manual de boas práticas em biodisponibilidade: bioequivalência/Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Gerência-Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos. Brasília: ANVISA, 2002.

Brasil. ANVISA. Resolução n. 899 de 29 maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 2003.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

Brasil. **Fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos**. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2006a.

Brasil. ANVISA. Resolução RE nº 1.170, de 19 de abril de 2006. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 2006b.

Brasil. Portaria GM nº 3.237. Aprova as normas de execução e de financiamento da assistência farmacêutica na atenção básica em saúde. **Ministério da Saúde**. Brasília-DF, 2007.

Brasil. Seminário internacional de práticas integrativas e complementares em saúde. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008a.

Brasil. ANVISA. Instrução normativa n. 5 de 11 de dezembro de 2008 - Determina a lista de registro simplificado de fitoterápicos no Brasil - Revoga o disposto da Resolução RE n. 89 de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da União**. Brasília - DF, 2008b.

---

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**. Brasília - DF, 2012.

Cass, Q. B.; Degani, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégia e Validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001.

Cataldi, T. R.; Bianco, G.; Abate, S. Profiling of N-acyl-homoserine lactones by liquid chromatography coupled with electrospray ionization and a hybrid quadrupole linear ion-trap and Fourier-transform ion-cyclotron-resonance mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-FTICR-MS). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 1, p. 82-96, 2008.

Cavalcanti, B. C.; Costa-Lotufo, L. V.; Moraes, M. O.; Burbano, R. R.; Silveira, E. R.; Cunha, K. M.; Rao, V. S.; Moura, D. J.; Rosa, R. M.; Henriques, J. A.; Pessoa, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in *Copaiba* oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 388-92, 2006.

Cavalcanti, B. C.; Ferreira, J. R. O.; Moura, D. J.; Rosa, R. M.; Furtado, G. V.; Burbano, R. R.; Silveira, E. R.; Lima, M. A. S.; Camara, C. A. G.; Saffi, J.; Henriques, J. A. P.; Rao, V. S. N.; Costa-Lotufo, L. V.; Moraes, M. O.; Pessoa, C. Structure-mutagenicity relationship of kaurenoic acid from *Xylopia sericeae* (Annonaceae) **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 701, n. 2, p. 154-163, 2010.

Choi, R. J.; Shin, E. M.; Jung, H. A.; Choi, J. S.; Kim, Y. S. Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. **Phytomedicine**, v. 18, n. 5, p. 677-682, 2011.

Ciola, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. São Paulo: Edgard Blucher, 1998.

Clarke, E. G. C. **Clarke's Isolation and Identification of Drugs**. London: Pharmaceutical Press, 1986.

Coimbra, R. **Notas de fitoterapia**. Rio de Janeiro: L. C. S. A., 1942.

Cole, R. B. **Electrospray Ionization Mass Spectrometry-fundamentals, Instrumentation & Applications**. New York: John Wiley&Sons, 1997.



---

Cortez, L. E. R.; Jacomossi, E.; Cortez, D. A. G. Levantamento de plantas medicinais usadas na medicina popular de Umuarama, PR. **Arquivo de Ciências da Saúde**, v. 3, n. 2, p. 97-104, 1999.

Costa-Lotufo, L. V.; Cunha, G. M.; Farias, P. A.; Viana, G. S.; Cunha, K. M.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Silveira, E. R.; Gramosa, N. V.; Rao, V. S. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1231-234, 2002.

Costa, R. J.; Diniz, A.; Mantovani, M. S.; Jordao, B. Q. *In vitro* study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linne and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 1, p. 86-93, 2008.

Dass, C. **Fundamentals of Contemporary mass spectrometry**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2007.

Dewick, P. M. **Medicinal Natural Products**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2004.

Dhillon, S.; Gill, K. **Basic pharmacokinetics**. London: Pharmaceutical Press, 2006.

Dipiro, J. T.; Spruill, W. J.; Wade, W. E.; Blouin, R. A.; Pruemer, J. M. **Concepts in clinical pharmacokinetics**. 5 ed. Bethesda: American Society of Health-Systems Pharmacists, 2010.

Dooley, K. C. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 471-481, 2003.

Egan, D. A.; O'Kennedy, R. Rapid and sensitive determination of coumarin and 7-hydroxycoumarin and its glucuronide conjugate in urine and plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 582, n. 1-2, p. 137-143, 1992.

Egan, D. A.; O'Kennedy, R. Spectrofluorimetric method for the quantification of 7-hydroxycoumarin in urine and plasma using both extracted and unextracted samples. **The Analyst**, v. 118, n. 2, p. 201-203, 1993.

FDA. Food and Drug Administration. **Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation**. United States Department of Health and Human Services, 2001.

---

Felter, S. P.; Vassallo, J. D.; Carlton, B. D.; Daston, G. P. A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 462-475, 2006.

Fernandes, J. B.; Vargas, V. M. Mutagenic and antimutagenic potential of the medicinal plants *M. laevigata* and *C. xanthocarpa*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 3, p. 269-73, 2003.

Flanagan, R. J.; Morgan, P. E.; Spencer, E. P.; Whelpton, R. Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review. **BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY**, v. 20, n. 1, p. 530-538, 2006.

Ford, R. A.; Hawkins, D. R.; Mayo, B. C.; Api, A. M. The *in vivo* dermal absorption and metabolism of [4-C-14]coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 2, p. 153-162, 2001.

Freire, S. E.; Sancho, G.; Bayón, N. D.; Katinas, L.; Gutiérrez, D. G.; Giuliano, D. A.; Sáenz, A. A.; Iharlegui, L.; Delucchi, G. Inventario de la biodiversidad vegetal de la provincia de Misiones: Asteraceae. **Darwiniana**, v. 44, n. 2, p. 375-452, 2006.

Freitas, T. P.; Silveira, P. C.; Rocha, L. G.; Rezin, G. T.; Rocha, J.; Citadini-Zanette, V.; Romao, P. T.; Dal-Pizzol, F.; Pinho, R. A.; Andrade, V. M.; Streck, E. L. Effects of *Mikania glomerata* Spreng. and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Asteraceae) extracts on pulmonary inflammation and oxidative stress caused by acute coal dust exposure. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 4, p. 761-6, 2008.

Galvani, F. R.; Barreneche, M. L. Levantamento das espécies vegetais utilizadas em medicina popular no município de Uruguai (RS). **Revista FZVA**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 1994.

Gasparetto, J. C.; Campos, F. R.; Budel, J. M.; Pontarolo, R. *Mikania glomerata* e *M. laevigata*: estudos agrônômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil - uma revisão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 627-640, 2010.

Gasparetto, J. C.; Francisco, T. M. G.; Campos, F. R.; Pontarolo, R. Development and validation of two methods based on high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining 1,2 benzopirone, dihydrocoumarin, o-coumaric acid, syringaldehyde and kaurenoic acid in guaco extracts and pharmaceutical preparations. **Journal of Separation Sciences**, v. 34, n. 1, p. 1-9, 2011a.

Gasparetto, J. C.; de Francisco, T. M. G.; Campos, F. R.; Pontarolo, R. Simultaneous determination of coumarin, o-coumaric acid, dihydrocoumarin and syringaldehyde in guaco extracts and pharmaceutical preparations by HPLC-DAD. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 2, n. 10, p. 2-7, 2011b.

Gasparetto, J. C.; Pontarolo, R.; De Francisco, T. M. G.; Campos, F. R. *Mikania glomerata* and *M. laevigata*: Clinical and Toxicological Advances. In: WILLIAM ACREE. **Toxicity and Drug Testing**. Rijeka: Intech, 2012. p. 297-320.

Gasparetto, J. C.; de Francisco, T. M. G.; Pontarolo, R. Chemical constituents of *Mikania glomerata* Spreng and *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 13, p.753-765, 2013.

Glish, G. L.; Vachet, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 140-150, 2003.

Graca, C.; Freitas, C. S.; Baggio, C. H.; Dalsenter, P. R.; Marques, M. C. *Mikania laevigata* syrup does not induce side effects on reproductive system of male Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 1, p. 29-32, 2007a.

Graca, C.; Baggio, C. H.; Freitas, C. S.; Rattmann, Y. D.; de Souza, L. M.; Cipriani, T. R.; Sasaki, G. L.; Rieck, L.; Pontarolo, R.; da Silva-Santos, J. E.; Marques, M. C. *In vivo* assessment of safety and mechanisms underlying *in vitro* relaxation induced by *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker in the rat trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 430-439, 2007b.

Guynton & Hall. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

Holmes, W. C. A review preparatory to an infrageneric classification of *Mikania* (tribe: Eupatorieae). In: Hind D.J.N, Jeffrey C., Pope G. V. *Advances in Compositae Systematics*. **Royal Botanical Gardens**, v. 97, n., p. 239-254, 1995.

Hoult, J. R. S.; Paya, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.

Houston, J. B. Drug metabolite kinetics. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 15, n. 3, p.521-552, 1982.

---

International Conference on Harmonization (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). **Internacional Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 2005.

Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO). Orientações sobre Validação de Métodos e Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008. **Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial**, 2003.

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Harmonized guidelines for international quality control in analytical chemistry laboratories. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 649-666, 1995.

Iskan, M.; Rostami, H.; Guray, T.; Iskan, M.; Pelkonen, O.; Rautio, A. Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in a Turkish population. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, n. 4, p.315-318, 1994.

Jardim de Flores. **Guaco o bom do inverno**. Disponível em <http://www.jardimdeflores.com.br/ERVAS/ervas2.html>. Acesso em 20/12/2012.

Judd, W. S.; Stevens, P. F.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sunderland: Sinauer Associates, 1999.

Kataoka, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 232-244, 2003.

Korfmacher, W. A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 10, n. 20, p. 1357-67, 2005.

Labaune, J. P. **Farmacocinética**. São Paulo: Organização Andrei Editora, 1993.

Lacy, A.; O'kenedy, R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 30, p. 3797-3811, 2004.

Lake, B. G. Coumarin metabolism, toxicity, and carcinogenicity: Relevance for human risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 423-453, 1999.

---

Lamiable, D.; Vistelle, R.; Trenque, T.; Fay, R.; H, M.; H, C. Sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of coumarin in plasma. **Journal of Chromatography**, v. 620, n. 2, p.273-277, 1993.

Lima, N. P.; Biasi, L. A. Estaquia semilhenosa e comparação de metabólitos secundários em *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker. **Scientia Agraria**, v. 3, n. 1-2, p. 113-132, 2002.

Lima, N. P. E. A. Produção de mudas por estaquia de duas espécies de guaco. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n.1, p. 106-109, 2003b.

Lucas, V. Estudo farmacognóstico do guaco *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Flora Medicinal**, v. 9, n. 1, p. 101-132, 1942.

Luize, P. S.; Tiuman, T. S.; Morello, L. G.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B. P.; Cortez, D. A. G.; Mello, J. C. P.; Nakamura, C. V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (L.) *amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 85-94, 2005.

Ma, J.; Shi, J.; Le, H.; Cho, R.; Huang, J. C.; Miao, S.; Wong, B. K. A fully automated plasma protein precipitation sample preparation method for LC-MS/MS bioanalysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1, n. 2, p. 219-226, 2008.

Maiorano, V. A.; Marcussi, S.; Daher, M. A.; Oliveira, C. Z.; Couto, L. B.; Gomes, O. A.; Franca, S. C.; Soares, A. M.; Pereira, P. S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 364-70, 2005.

Matos, F. J. A. **Plantas medicinais: Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. 2 ed. Fortaleza: Imprensa Universitária - UFC, 2000.

Meineke, I.; Desel, H.; Kahl, R.; Kahl, G. F.; Gundert-Remy, U. Determination of 2-hydroxyphenylacetic acid (2HPAA) in urine after oral and parenteral administration of coumarin by gas-liquid chromatography with flame-ionization detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, n. 3, p.487-492, 1998.

Moraes, M. D. **A família Asteraceae na planície litorânea de Picinguaba município de Ubatuba**. 154 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1997.

Muir, K. T.; Gomeni, R. O. Non-compartmental analysis. In: PETER L. BONATE e DANNY R. HOWARD. **Pharmacokinetics in drug development: clinical study and analysis**. AAPS PRESS, 2004.

Napimoga, M. H.; Yatsuda, R. Scientific evidence for *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* as a pharmacological tool. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 7, p. 809-20, 2010.

National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Coumarin (CAS No. 91-64-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). Department of Health and Human Services: USA Government. **National Toxicology Program Technical Report Series**. v. 422: 1-340, 1993.

Neves, L. J.; Sá, M. F. A. Contribuição ao estudo de plantas medicinais *Mikania glomerata* Spreng. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 72, n. 2, p. 42-47, 1991.

Nováková, L.; Vlcková, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1, p. 8-35, 2009.

O'Kennedy, R.; Thornes, R. D. **Coumarins: Biology, applications and mode of action**. Chichester: John Wiley, 1997.

Oliveira, F. Contribuição para o estudo botânico de *Mikania hirsutissima* DC. variedade *hirsutissima*. II morfologia externa e anatomia da folha, flor, fruto e semente. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 10, n. 1, p. 15-36, 1972.

Oliveira, F.; Akisue, G.; Akisue, M. K.; Jorge, L. I. F. Morfodiagnose das folhas e das partes reprodutivas de *Mikania Laevigata* Shultz Bip ex Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 1, p. 20-34, 1986.

Organização Mundial da Saúde. **Global Database on Body Mass Index. Body Mass Index Classification**. Disponível em [http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html). Acesso em 11/03/2013

Patel, D. Matriz effect in a view of LC-MS/MS: An overview. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 1, p.559-564, 2011.

---

Patel, K.; Kirkpatrick, C. M. J. Pharmacokinetic Concepts Revisited - Basic and Applied. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, n. 12, p. 1983-1990, 2011.

Pereira, R. C.; Oliveira, M. T. R.; Lemos, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 37-40, 2004.

PubChem. Compound summary (CID 323). Disponível em <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=323#x27>. Acesso em 29/05/2013.

Ramanitrahambola, D.; Rakotondramanana, D. A.; Rasoanaivo, P.; Randrianthoa, A.; Ratsimamanga, S.; Palazzino, G.; Galeffi, C.; Nicoletti, M. Bronchodilator activity of *Phymatodes scolopendria* (Burm.) ching and its bioactive constituent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 400-407, 2005.

Rautio, A.; Kraul, H.; Salmela, E.; Pelkonen, O. Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in healthy volunteers. **Pharmacogenetics**, v. 2, n. 5, p.227-233, 1992.

Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

Ritschel, W. A.; Ho Mann, K. A.; Tan, H. S.; Sanders, P. R. Pharmacokinetics of coumarin upon i. v. administration in man. **Arzneimittel-Forschung (Drug Research)**, v. 26, n. 7, p. 1382 - 1387, 1976.

Ritschel, W. A.; Brady, M. E.; Tan, H. S. I.; Hoffman, K. A.; Yiu, I. M.; Grummich, K. W. Pharmacokinetics of coumarin and its 7-hydroxy-metabolites upon intravenous and peroral administration of coumarin in man. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 12, n. 6, p. 457-461, 1977.

Ritschel, W. A.; Brady, M. E.; Tan, H. S. First-pass effect of coumarin in man. **International Journal of Clinical Pharmacology and Biopharmacy**, v. 17, n. 3, p.99-103, 1979.

Ritschel, W. A.; Hoffman, K. A. Pilot study on bioavailability of coumarin and 7-hydroxycoumarin upon peroral administration of coumarin in a sustained-release dosage form. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 21, n. 7, p. 294-300, 1981.

---

---

Ritschel, W. A.; Alcorn, G. J.; Ritschel, G. B. Therapeutic Concentration of Coumarin as Antipyretic. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 6, n. 7, p. 363-365, 1984.

Ritter, M. R.; Miotto, S. T. S. Taxonomia de *Mikania* Willd. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Hoehnea**, v. 32, n. 3, p. 309-359, 2005.

Rovei, V.; Chanoine, F.; Benedettif, M. S. Pharmacokinetics of theophylline: A dose-range study. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 14, n. 6, p.769-778, 1982.

Ruppelt, B. M.; Pereira, E. F.; Goncalves, L. C.; Pereira, N. A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom: I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86 n. 2, p. 203-205, 1991.

Sá, R. C. S.; Leite, M. N.; Almeida, R. N. Toxicological screening of *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, extract in male Wistar rats reproductive system, sperm production and testosterone level after chronic treatment. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 718-723, 2010.

Sá, R. C. S.; Leite, M. N.; Peters, V. M.; Guerra, M. O.; Almeida, R. N. Absence of mutagenic effect of *Mikania glomerata* hydroalcoholic extract on adult Wistar rats *in vivo*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 4, p. 599-604, 2006.

Sá, R. C. S.; Leite, M. N.; Reporedo, M. M.; Almeida, R. N. Evaluation of long-term exposure to *Mikania glomerata*. **Contraception**, v. 67, n. 4, p. 327-331, 2003.

Salgado, H. R. N.; Roncari, A. F. F.; Moreira, R. R. D. Antidiarrhoeal effects of *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) leaf extract in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 205-208, 2005.

Santos, S. C.; Krueger, C. L.; Steil, A. A.; Krueger, M. R.; Biavatti, M. W.; Wisnewski Junior, A. LC characterisation of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. **Planta Medica**, v. 72, n. 8, p. 679-684, 2006.

Shah, V. P. The history of bioanalytical method validation and regulation: Evolution of a guidance document on bioanalytical methods validation. **The APPS Journal**, v. 9, n. 1, p. 43-47, 2007.

---



Shilling, W. H.; Crampton, R. F.; Longland, R. C. Metabolism of Coumarin in Man. **Nature**, v. 221, n. 5181, p.664-665, 1969.

Shin, J.; Pauly, D. F.; Johnson, J. A.; Frye, R. F. Simplified method for determination of clarithromycin in human plasma using protein precipitation in a 96-well format and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 871, n. 1, p. 130-134, 2008.

Smyth, W. F. Recent studies on the electrospray ionisation mass spectrometric behaviour of selected nitrogen-containing drug molecules and its application to drug analysis using liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 824, n. 1-2, p. 1-20, 2005.

Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2 ed. Danvers: John Wiley & Sons, 1997.

Soares, A. K. A.; Carmo, G. C. C.; Quental, D. P.; Nascimento, D. F.; Bezerra, F. A. F.; Moraes, O. M.; Moraes, M. E. A. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 447-454, 2006.

Soares de Moura, R.; Costa, S. S.; Jansen, J. M.; Silva, C. A.; Lopes, C. S.; Bernardo-Filho, M.; Nascimento Da Silva, V.; Criddle, D. N.; Portela, B. N.; Rubenich, L. M.; Araujo, R. G.; Carvalho, L. C. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 249-56, 2002.

Souza, C. D.; Felfili, J. M. Uso de plantas medicinais na região de alto paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

Suyenaga, E. S.; Reche, E.; Farias, F. M.; Schapoval, E. E.; Chaves, C. G.; Henriques, A. T. Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania*. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 6, p. 519-23, 2002.

Tavares, J. P.; Martins, I. L.; Vieira, A. S.; Lima, F. A. V.; Bezerra, F. A. F.; Moraes, M. O.; Moraes, M. E. A. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico a base de associações de plantas, mel e própolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 350-356, 2006.

---

---

Thornes, R. D.; Lynch, G.; Sheehan, M. W. Cimetidine and coumarin therapy of melanoma. **The Lancet**, v. 320, n. 8293, p.328, 1982.

Thornes, D.; Daly, L.; Lynch, G.; Browne, H.; Tanner, A.; Keane, F.; O'loughlin, S.; Corrigan, T.; Daly, P.; Edwards, G.; Breslin, B.; Browne, H.; Shine, M.; Lennon, F.; Hanley, J.; McMurray, N.; Gaffney, E. Prevention of early recurrence of high risk malignant melanoma by coumarin. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 15, n. 1, p.431-435, 1989.

Thornes, R. D.; Daly, L.; Lynch, G.; Breslin, B.; Browne, H.; Browne, H. Y.; Corrigan, T.; Daly, P.; Edwards, G.; Gaffney, E.; Henley, J.; Healy, T.; Keane, F.; Lennon, F.; McMurray, N.; Oloughlin, S.; Shine, M.; Tanner, A. Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant-melanoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 120, n., p. S32-S34, 1994.

Tirapelli, C. R.; Ambrosio, S. R.; da Costa, F. B.; de Oliveira, A. M. Inhibitory action of kaurenoic acid from *Viguiera robusta* (Asteraceae) on phenylephrine-induced rat carotid contraction. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 56-62, 2002.

Tirapelli, C. R.; Ambrosio, S. R.; Da Costa, F. B.; Coutinho, S. T.; de Oliveira, D. C. R.; de Oliveira, A. M. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, n. 2-3, p. 233-241, 2004.

Tonhi, E.; Collins, K. E.; Jardins, I. C. S. F.; Collins, C. H. Fases estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

Toutain, P. L.; Bousquet-Mélou, A. Plasma clearance. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 6, p.415–425, 2004a.

Toutain, P. L.; Bousquet-Mélou, A. Plasma terminal half-life. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 6, p.427-439, 2004b.

Tozer, T. N.; Rowland, M. **Introdução à farmacocinética e à farmacodinâmica: As bases quantitativas da terapia farmacológica**. Porto Alegre: Artmed, 2009.

USP. **The United States Pharmacopeia**. USP 30 - NF 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

---

---

Van Bramer, S. E. **An introduction to mass spectrometry**. Chester: Widener University, 1997.

Vasconcelos, J. F.; Teixeira, M. M.; Barbosa, J. M.; Agra, M. F.; Nunes, X. P.; Giulietti, A. M.; Ribeiro-dos-Santos, R.; Soares, M. B. P. Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 609, n. 1-3, p. 126-131, 2009.

Vendruscolo, G. S.; Mentz, L. A. Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 2, p. 367-382, 2006.

Wal, P.; Kumar, B.; Bhandari, A.; Rai, A. K.; Wal, A. Bioanalytical method development–Determination of drugs in biological fluids. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 10, p. 333-347, 2010.

Wang, Q.; Jia, R.; Ye, C.; Garcia, M.; Li, J. B.; Hidalgo, I. J. Glucuronidation and sulfation of 7-hydroxycoumarin in liver matrices from human, dog, monkey, rat, and mouse. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 41, n. 3-4, p. 97-103, 2005.

Wen, J.; Wu, L.; Zhang, Y.; Fan, Y.; Wu, Z. High-throughput determination of fudosteine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, following protein precipitation in the 96-well plate format **Journal of Chromatography B**, v. 867, n. 1, p. 153-159, 2008.

West, G. B.; Brown, J. H. The origin of allometric scaling laws in biology from genomes to ecosystems: towards a quantitative unifying theory of biological structure and organization. **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 9, p.1575 - 1592, 2005.

White, C. R.; Seymour, R. S. Allometric scaling o mammalian metabolism. **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 9, p.1611-1619, 2005.

Yang, L.; Wu, N.; Clement, R. P.; Rudewicz, P. J. Validation and application of a liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the determination of SCH 211803 in rat and monkey plasma using automated 96-well protein precipitation **Journal of Chromatography B**, v. 799, n. 2, p. 271-280, 2004.

---

---

---

## ***7. ANEXO 1***

---

---

---

---

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a) Você, homem ou mulher, está sendo convidado a participar de um estudo intitulado “Avaliação da biodisponibilidade dos principais metabólitos secundários do guaco a partir da forma farmacêutica xarope”. É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços importantes em todas as áreas, e sua participação é fundamental.
  - b) O objetivo desta pesquisa é desenvolver métodos de análise para dosear no plasma as principais substâncias presentes no xarope de guaco. A partir de então poderemos conhecer o comportamento dessas substâncias no organismo, e então propor o uso correto e seguro do xarope de guaco.
  - c) Caso você participe da pesquisa, será necessário comparecer ao CEB/UFPR, localizado na Rua Prefeito Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba/PR, para uma consulta médica onde será avaliado a pressão arterial, o índice de massa corporal, bem como os parâmetros de inclusão por meio de um questionário específico. Caso aprovado na primeira etapa, você será encaminhado a um laboratório de análises clínicas, designado pelo CEB-UFPR em local e data definidos, onde será realizado um eletrocardiograma e exames laboratoriais (uma coleta de sangue e uma coleta de urina). Conforme os resultados dos exames, você será selecionado ou não para o estudo.
  - d) Como em qualquer tratamento, você poderá experimentar algum desconforto, principalmente relacionado à punção proveniente da coleta de sangue.
  - e) É pouco provável a intercorrência de riscos em seu tratamento pela própria característica do xarope, salvo em caso de hipersensibilidade do voluntário a qualquer um dos componentes da fórmula. Para todas as coletas de sangue serão utilizados materiais estéreis e descartáveis.
  - f) Se for selecionado para o estudo, você deverá comparecer ao Hospital de Clínicas da UFPR localizado na Av. General Carneiro, 181, Curitiba/PR, em data, local e hora determinados, onde será realizada a coleta de sangue. Você não poderá levar nenhum tipo de alimento para o hospital, pois após o início do estudo você receberá dieta padronizada. Após jejum de 12 horas você tomará o xarope de guaco. Será realizada coleta de 3 mL de sangue nos tempos 0, 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 240, 360, 480, 540 e 600 após a administração do xarope. Ao final do estudo você será novamente encaminhado a clínica e ao laboratório de análises clínicas (local e data definidos), onde serão novamente realizados os exames laboratoriais (uma coleta de sangue e uma coleta de urina).
  - g) Embora não exista nenhum benefício direto aos voluntários por sua participação, o mesmo trará benefícios a população, pois a partir do estudo de biodisponibilidade será possível estabelecer as bases para futuros estudos clínicos que avaliem a real efetividade do xarope de guaco.
-

- 
- h) O pesquisador Roberto Pontarolo, farmacêutico, professor e coordenador da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR é o responsável pela pesquisa, e poderá esclarecer eventuais dúvidas a respeito de sua participação. A qualquer momento você poderá entrar em contato com o Prof. Roberto pelo email pontarolo@ufpr.br, ou pelo telefone 41-33604094.
- i) Estão garantidas todas as informações que você queira, antes durante e depois do estudo.

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

Orientador \_\_\_\_\_ Orientado \_\_\_\_\_

#### CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter sido devidamente esclarecido sobre a justificativa, objetivos da pesquisa e os procedimentos a que serei submetido, e receber a garantia de ser esclarecido sobre qualquer dúvida e de ter a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, consinto, de livre e espontânea vontade, em participar da pesquisa “Avaliação da biodisponibilidade dos principais metabólitos secundários do guaco a partir da forma farmacêutica xarope”.

\_\_\_\_\_  
Voluntário

\_\_\_\_\_  
Testemunha 1

\_\_\_\_\_  
Testemunha 2

---

---

## **8. ANEXO 2**

---

---

Input File: Workbook - [D:\Gustavo\T...\analito - lista.csv]  
 formname=7-hidroxicumarina  
 subject=1

Date: 9/02/2012  
 Time: 21:56:43

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM  
 Version 5.3 Build 200912111339  
 Core Version 18Sept2006

Settings

-----  
 Model: Plasma Data, Extravascular Administration  
 Number of nonmissing observations: 15  
 Dose time: 0.00  
 Dose amount: 1500.00  
 Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation  
 Weighting for lambda\_z calculations: Uniform weighting  
 Lambda\_z method: Find best fit for lambda\_z, Log regression

Summary Table

Time hr	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC hr*ng/mL	AUMC hr*hr*ng/mL	Weight
0.0000	0.0000			0.0000	0.0000	
0.1700	22.80			1.938	0.3295	
0.3300	20.60			5.410	1.183	
0.5000	17.50			8.649	2.505	
0.7500	18.00			13.09	5.286	
1.000	17.00			17.46	9.099	
1.250	37.60			24.29	17.10	
1.500	23.70			31.95	27.42	
2.000 *	26.60	24.33	2.265	44.52	49.60	1.000
2.500 *	20.20	18.46	1.735	56.22	75.53	1.000
3.000 *	12.90	14.01	-1.111	64.50	97.83	1.000
4.000 *	6.530	8.067	-1.537	74.21	130.2	1.000
6.000 *	3.000	2.674	0.3261	83.74	174.4	1.000
8.000	0.0000			86.74	192.4	
10.00	0.0000			86.74	192.4	

\*) Starred values were included in the estimation of Lambda\_z.

Final Parameters

-----  
 Rsq 0.9742  
 Rsq\_adjusted 0.9656  
 Corr\_XY -0.9870  
 No\_points\_lambda\_z 5  
 Lambda\_z 1/hr 0.5521  
 Lambda\_z\_lower hr 2.0000  
 Lambda\_z\_upper hr 6.0000  
 HL\_Lambda\_z hr 1.2555  
 Tlag hr 0.0000  
 Tmax hr 1.2500  
 Cmax ng/mL 37.6000  
 Cmax\_D ng/mL/mg 0.0251  
 Tlast hr 6.0000  
 Clast ng/mL 3.0000  
 AUClast hr\*ng/mL 83.7435  
 AUCall hr\*ng/mL 86.7435  
 AUCINF\_obs hr\*ng/mL 89.1774  
 AUCINF\_D\_obs hr\*ng/mL/mg 0.0595  
 AUC\_%Extrap\_obs % 6.0933  
 Vz\_F\_obs mL 30466632.5167  
 Cl\_F\_obs mL/hr 16820411.1656  
 AUCINF\_pred hr\*ng/mL 88.5867  
 AUCINF\_D\_pred hr\*ng/mL/mg 0.0591  
 AUC\_%Extrap\_pred % 5.4672  
 Vz\_F\_pred mL 30669775.8336  
 Cl\_F\_pred mL/hr 16932565.1464  
 AUMClast hr\*hr\*ng/mL 174.3600  
 AUMCINF\_obs hr\*hr\*ng/mL 216.8055  
 AUMC\_%Extrap\_obs % 19.5777  
 AUMCINF\_pred hr\*hr\*ng/mL 212.1916  
 AUMC\_%Extrap\_pred % 17.8290  
 MRTlast hr 2.0821  
 MRTINF\_obs hr 2.4312  
 MRTINF\_pred hr 2.3953



Input File: Workbook - [D:\Gustavo\T...\analito - lista.csv]  
 formname=7-hidroxicumarina  
 subject=2

Date: 9/02/2012  
 Time: 21:56:43

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM  
 Version 5.3 Build 200912111339  
 Core Version 18Sept2006

Settings

-----  
 Model: Plasma Data, Extravascular Administration  
 Number of nonmissing observations: 15  
 Dose time: 0.00  
 Dose amount: 1500.00  
 Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation  
 Weighting for lambda\_z calculations: Uniform weighting  
 Lambda\_z method: Find best fit for lambda\_z, Log regression

Summary Table

Time hr	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC hr*ng/mL	AUMC hr*hr*ng/mL	Weight
0.0000	0.0000			0.0000	0.0000	
0.1700	0.6150			0.05228	0.008887	
0.3300	2.080			0.2679	0.07216	
0.5000	5.100			0.8782	0.3473	
0.7500	24.50			4.578	2.963	
1.000	20.60			10.22	7.835	
1.250	39.60			17.74	16.60	
1.500	52.20			29.22	32.57	
2.000	40.20			52.32	72.25	
2.500	127.0			94.12	171.7	
3.000 *	15.70	17.78	-2.076	129.8	262.9	1.000
4.000 *	16.20	13.45	2.754	145.7	318.8	1.000
6.000 *	7.230	7.693	-0.4633	169.2	427.0	1.000
8.000	0.0000			176.4	470.4	
10.00	0.0000			176.4	470.4	

\*) Starred values were included in the estimation of Lambda\_z.

Final Parameters

-----  
 Rsq 0.8707  
 Rsq\_adjusted 0.7415  
 Corr\_XY -0.9331  
 No\_points\_lambda\_z 3  
 Lambda\_z 1/hr 0.2792  
 Lambda\_z\_lower hr 3.0000  
 Lambda\_z\_upper hr 6.0000  
 HL\_Lambda\_z hr 2.4828  
 Tlag hr 0.0000  
 Tmax hr 2.5000  
 Cmax ng/mL 127.0000  
 Cmax\_D ng/mL/mg 0.0847  
 Tlast hr 6.0000  
 Clast ng/mL 7.2300  
 AUClast hr\*ng/mL 169.1707  
 AUCall hr\*ng/mL 176.4007  
 AUCINF\_obs hr\*ng/mL 195.0684  
 AUCINF\_D\_obs hr\*ng/mL/mg 0.1300  
 AUC\_%Extrap\_obs % 13.2762  
 Vz\_F\_obs mL 27543995.1261  
 Cl\_F\_obs mL/hr 7689612.3707  
 AUCINF\_pred hr\*ng/mL 196.7277  
 AUCINF\_D\_pred hr\*ng/mL/mg 0.1312  
 AUC\_%Extrap\_pred % 14.0077  
 Vz\_F\_pred mL 27311664.6866  
 Cl\_F\_pred mL/hr 7624751.3724  
 AUMClast hr\*hr\*ng/mL 427.0023  
 AUMCINF\_obs hr\*hr\*ng/mL 675.1531  
 AUMC\_%Extrap\_obs % 36.7548  
 AUMCINF\_pred hr\*hr\*ng/mL 691.0532  
 AUMC\_%Extrap\_pred % 38.2099  
 MRTlast hr 2.5241  
 MRTINF\_obs hr 3.4611  
 MRTINF\_pred hr 3.5127

Input File: Workbook - [D:\Gustavo\T...\analito - lista.csv]  
 formname=7-hidroxicumarina  
 subject=3

Date: 9/02/2012  
 Time: 21:56:43

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM  
 Version 5.3 Build 200912111339  
 Core Version 18Sept2006

Settings

-----  
 Model: Plasma Data, Extravascular Administration  
 Number of nonmissing observations: 15  
 Dose time: 0.00  
 Dose amount: 1500.00  
 Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation  
 Weighting for lambda\_z calculations: Uniform weighting  
 Lambda\_z method: Find best fit for lambda\_z, Log regression

Summary Table

Time hr	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC hr*ng/mL	AUMC hr*hr*ng/mL	Weight
0.0000	0.0000			0.0000	0.0000	
0.1700	4.700			0.3995	0.06792	
0.3300	27.50			2.976	0.8578	
0.5000	18.60			6.894	2.420	
0.7500	52.10			15.73	8.467	
1.000	71.80			31.22	22.33	
1.250	112.0			54.19	48.80	
1.500	127.0			84.07	90.11	
2.000 *	96.40	109.6	-13.16	139.9	185.9	1.000
2.500 *	37.30	39.19	-1.890	173.3	257.5	1.000
3.000 *	19.50	14.02	5.481	187.5	295.4	1.000
4.000 *	1.540	1.794	-0.2539	198.1	327.7	1.000
6.000	0.0000			199.6	333.9	
8.000	0.0000			199.6	333.9	
10.00	0.0000			199.6	333.9	

\*) Starred values were included in the estimation of Lambda\_z.

Final Parameters

-----  
 Rsq 0.9839  
 Rsq\_adjusted 0.9759  
 Corr\_XY -0.9919  
 No\_points\_lambda\_z 4  
 Lambda\_z 1/hr 2.0560  
 Lambda\_z\_lower hr 2.0000  
 Lambda\_z\_upper hr 4.0000  
 HL\_Lambda\_z hr 0.3371  
 Tlag hr 0.0000  
 Tmax hr 1.5000  
 Cmax ng/mL 127.0000  
 Cmax\_D ng/mL/mg 0.0847  
 Tlast hr 4.0000  
 Clast ng/mL 1.5400  
 AUClast hr\*ng/mL 198.0640  
 AUCall hr\*ng/mL 199.6040  
 AUCINF\_obs hr\*ng/mL 198.8130  
 AUCINF\_D\_obs hr\*ng/mL/mg 0.1325  
 AUC\_%Extrap\_obs % 0.3767  
 Vz\_F\_obs mL 3669631.9026  
 Cl\_F\_obs mL/hr 7544777.2784  
 AUCINF\_pred hr\*ng/mL 198.9365  
 AUCINF\_D\_pred hr\*ng/mL/mg 0.1326  
 AUC\_%Extrap\_pred % 0.4386  
 Vz\_F\_pred mL 3667353.4924  
 Cl\_F\_pred mL/hr 7540092.8585  
 AUMClast hr\*hr\*ng/mL 327.7185  
 AUMCINF\_obs hr\*hr\*ng/mL 331.0789  
 AUMC\_%Extrap\_obs % 1.0150  
 AUMCINF\_pred hr\*hr\*ng/mL 331.6330  
 AUMC\_%Extrap\_pred % 1.1804  
 MRTlast hr 1.6546  
 MRTINF\_obs hr 1.6653  
 MRTINF\_pred hr 1.6670

Input File: Workbook - [D:\Gustavo\T...\analito - lista.csv]  
 formname=7-hidroxicumarina  
 subject=4

Date: 9/02/2012  
 Time: 21:56:43

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM  
 Version 5.3 Build 200912111339  
 Core Version 18Sept2006

Settings

-----  
 Model: Plasma Data, Extravascular Administration  
 Number of nonmissing observations: 15  
 Dose time: 0.00  
 Dose amount: 1500.00  
 Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation  
 Weighting for lambda\_z calculations: Uniform weighting  
 Lambda\_z method: Find best fit for lambda\_z, Log regression

Summary Table

Time hr	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC hr*ng/mL	AUMC hr*hr*ng/mL	Weight
0.0000	0.0000			0.0000	0.0000	
0.1700	12.70			1.080	0.1835	
0.3300	8.220			2.753	0.5732	
0.5000	48.30			7.557	2.857	
0.7500	66.80			21.94	12.14	
1.000	40.00			35.29	23.40	
1.250	49.60			46.49	36.15	
1.500	19.50			55.13	47.56	
2.000	27.72			66.94	68.73	
2.500 *	7.410	7.535	-0.1253	75.72	87.22	1.000
3.000 *	4.680	4.564	0.1163	78.74	95.36	1.000
4.000 *	1.660	1.674	-0.01398	81.91	105.7	1.000
6.000	0.0000			83.57	112.3	
8.000	0.0000			83.57	112.3	
10.00	0.0000			83.57	112.3	

\*) Starred values were included in the estimation of Lambda\_z.

Final Parameters

-----  
 Rsq 0.9992  
 Rsq\_adjusted 0.9983  
 Corr\_XY -0.9996  
 No\_points\_lambda\_z 3  
 Lambda\_z 1/hr 1.0029  
 Lambda\_z\_lower hr 2.5000  
 Lambda\_z\_upper hr 4.0000  
 HL\_Lambda\_z hr 0.6911  
 Tlag hr 0.0000  
 Tmax hr 0.7500  
 Cmax ng/mL 66.8000  
 Cmax\_D ng/mL/mg 0.0445  
 Tlast hr 4.0000  
 Clast ng/mL 1.6600  
 AUClast hr\*ng/mL 81.9123  
 AUCall hr\*ng/mL 83.5723  
 AUCINF\_obs hr\*ng/mL 83.5674  
 AUCINF\_D\_obs hr\*ng/mL/mg 0.0557  
 AUC\_%Extrap\_obs % 1.9806  
 Vz\_F\_obs mL 17897079.1699  
 Cl\_F\_obs mL/hr 17949573.4899  
 AUCINF\_pred hr\*ng/mL 83.5814  
 AUCINF\_D\_pred hr\*ng/mL/mg 0.0557  
 AUC\_%Extrap\_pred % 1.9970  
 Vz\_F\_pred mL 17894094.2695  
 Cl\_F\_pred mL/hr 17946579.8344  
 AUMClast hr\*hr\*ng/mL 105.7016  
 AUMCINF\_obs hr\*hr\*ng/mL 113.9724  
 AUMC\_%Extrap\_obs % 7.2569  
 AUMCINF\_pred hr\*hr\*ng/mL 114.0421  
 AUMC\_%Extrap\_pred % 7.3136  
 MRTlast hr 1.2904  
 MRTINF\_obs hr 1.3638  
 MRTINF\_pred hr 1.3644

Input File: Workbook - [D:\Gustavo\T...\analito - lista.csv]  
 formname=7-hidroxicumarina  
 subject=5

Date: 9/02/2012  
 Time: 21:56:43

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM  
 Version 5.3 Build 200912111339  
 Core Version 18Sept2006

Settings

-----  
 Model: Plasma Data, Extravascular Administration  
 Number of nonmissing observations: 15  
 Dose time: 0.00  
 Dose amount: 1500.00  
 Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation  
 Weighting for lambda\_z calculations: Uniform weighting  
 Lambda\_z method: Find best fit for lambda\_z, Log regression

Summary Table

Time hr	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC hr*ng/mL	AUMC hr*hr*ng/mL	Weight
0.0000	0.0000			0.0000	0.0000	
0.1700	20.60			1.751	0.2977	
0.3300	44.40			6.951	1.750	
0.5000	59.00			15.74	5.503	
0.7500	59.70			30.58	14.79	
1.000	66.50			46.35	28.70	
1.250	49.30			60.83	44.71	
1.500	49.10			73.13	61.62	
2.000	14.40			89.00	87.23	
2.500 *	5.290	5.238	0.05213	93.93	97.74	1.000
3.000 *	3.700	3.755	-0.05538	96.17	103.8	1.000
4.000 *	1.940	1.930	0.009583	98.99	113.3	1.000
6.000	0.0000			100.9	121.0	
8.000	0.0000			100.9	121.0	
10.00	0.0000			100.9	121.0	

\*) Starred values were included in the estimation of Lambda\_z.

Final Parameters

-----  
 Rsq 0.9993  
 Rsq\_adjusted 0.9987  
 Corr\_XY -0.9997  
 No\_points\_lambda\_z 3  
 Lambda\_z 1/hr 0.6655  
 Lambda\_z\_lower hr 2.5000  
 Lambda\_z\_upper hr 4.0000  
 HL\_Lambda\_z hr 1.0416  
 Tlag hr 0.0000  
 Tmax hr 1.0000  
 Cmax ng/mL 66.5000  
 Cmax\_D ng/mL/mg 0.0443  
 Tlast hr 4.0000  
 Clast ng/mL 1.9400  
 AUClast hr\*ng/mL 98.9925  
 AUCall hr\*ng/mL 100.9325  
 AUCINF\_obs hr\*ng/mL 101.9078  
 AUCINF\_D\_obs hr\*ng/mL/mg 0.0679  
 AUC\_%Extrap\_obs % 2.8607  
 Vz\_F\_obs mL 22119070.5060  
 Cl\_F\_obs mL/hr 14719185.8294  
 AUCINF\_pred hr\*ng/mL 101.8934  
 AUCINF\_D\_pred hr\*ng/mL/mg 0.0679  
 AUC\_%Extrap\_pred % 2.8470  
 Vz\_F\_pred mL 22122196.5774  
 Cl\_F\_pred mL/hr 14721266.0808  
 AUMClast hr\*hr\*ng/mL 113.2517  
 AUMCINF\_obs hr\*hr\*ng/mL 129.2938  
 AUMC\_%Extrap\_obs % 12.4075  
 AUMCINF\_pred hr\*hr\*ng/mL 129.2146  
 AUMC\_%Extrap\_pred % 12.3538  
 MRTlast hr 1.1440  
 MRTINF\_obs hr 1.2687  
 MRTINF\_pred hr 1.2681

Input File: Workbook - [D:\Gustavo\T...\analito - lista.csv]  
 formname=ácido o-cumárico  
 subject=1

Date: 9/02/2012  
 Time: 21:56:44

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM  
 Version 5.3 Build 200912111339  
 Core Version 18Sept2006

Settings

-----  
 Model: Plasma Data, Extravascular Administration  
 Number of nonmissing observations: 15  
 Dose time: 0.00  
 Dose amount: 1500.00  
 Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation  
 Weighting for lambda\_z calculations: Uniform weighting  
 Lambda\_z method: Find best fit for lambda\_z, Log regression

Summary Table

Time hr	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC hr*ng/mL	AUMC hr*hr*ng/mL	Weight
0.0000	0.0000			0.0000	0.0000	
0.1700	32.80			2.788	0.4740	
0.3300	24.50			7.372	1.567	
0.5000	20.00			11.15	3.104	
0.7500	19.00			16.03	6.135	
1.000	8.980			19.53	9.039	
1.250	15.20			22.55	12.54	
1.500	31.40			28.37	20.80	
2.000	38.90			45.95	52.02	
2.500	29.70			63.10	90.04	
3.000 *	29.00	28.79	0.2056	77.77	130.3	1.000
4.000 *	24.80	24.59	0.2131	104.7	223.4	1.000
6.000 *	17.80	17.93	-0.1264	147.3	429.4	1.000
8.000 *	12.60	13.07	-0.4703	177.7	637.0	1.000
10.00 *	9.800	9.530	0.2704	200.1	835.8	1.000

\*) Starred values were included in the estimation of Lambda\_z.

Final Parameters

-----  
 Rsq 0.9972  
 Rsq\_adjusted 0.9963  
 Corr\_XY -0.9986  
 No\_points\_lambda\_z 5  
 Lambda\_z 1/hr 0.1580  
 Lambda\_z\_lower hr 3.0000  
 Lambda\_z\_upper hr 10.0000  
 HL\_Lambda\_z hr 4.3879  
 Tlag hr 0.0000  
 Tmax hr 2.0000  
 Cmax ng/mL 38.9000  
 Cmax\_D ng/mL/mg 0.0259  
 Tlast hr 10.0000  
 Clast ng/mL 9.8000  
 AUClast hr\*ng/mL 200.0745  
 AUCall hr\*ng/mL 200.0745  
 AUCINF\_obs hr\*ng/mL 262.1126  
 AUCINF\_D\_obs hr\*ng/mL/mg 0.1747  
 AUC\_%Extrap\_obs % 23.6685  
 Vz\_F\_obs mL 36227268.1386  
 Cl\_F\_obs mL/hr 5722732.1435  
 AUCINF\_pred hr\*ng/mL 260.4011  
 AUCINF\_D\_pred hr\*ng/mL/mg 0.1736  
 AUC\_%Extrap\_pred % 23.1668  
 Vz\_F\_pred mL 36465373.6828  
 Cl\_F\_pred mL/hr 5760345.0887  
 AUMClast hr\*hr\*ng/mL 835.8491  
 AUMCINF\_obs hr\*hr\*ng/mL 1848.9564  
 AUMC\_%Extrap\_obs % 54.7935  
 AUMCINF\_pred hr\*hr\*ng/mL 1821.0069  
 AUMC\_%Extrap\_pred % 54.0996  
 MRTlast hr 4.1777  
 MRTINF\_obs hr 7.0541  
 MRTINF\_pred hr 6.9931

Input File: Workbook - [D:\Gustavo\T...\analito - lista.csv]  
 formname=ácido o-cumárico  
 subject=2

Date: 9/02/2012  
 Time: 21:56:44

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM  
 Version 5.3 Build 200912111339  
 Core Version 18Sept2006

Settings

-----  
 Model: Plasma Data, Extravascular Administration  
 Number of nonmissing observations: 15  
 Dose time: 0.00  
 Dose amount: 1500.00  
 Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation  
 Weighting for lambda\_z calculations: Uniform weighting  
 Lambda\_z method: Find best fit for lambda\_z, Log regression

Summary Table

Time hr	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC hr*ng/mL	AUMC hr*hr*ng/mL	Weight
0.0000	0.0000			0.0000	0.0000	
0.1700	96.00			8.160	1.387	
0.3300	51.40			19.95	4.050	
0.5000	42.60			27.94	7.302	
0.7500	107.0			46.64	20.00	
1.000	77.00			69.64	39.65	
1.250	142.0			97.02	71.46	
1.500	455.0			171.6	179.0	
2.000	300.0			360.4	499.6	
2.500	175.0			479.1	759.0	
3.000	101.0			548.1	944.1	
4.000 *	90.20	87.19	3.009	643.7	1276.	1.000
6.000 *	44.20	48.11	-3.907	778.1	1902.	1.000
8.000 *	28.40	26.54	1.857	850.7	2394.	1.000
10.00 *	14.40	14.64	-0.2448	893.5	2766.	1.000

\*) Starred values were included in the estimation of Lambda\_z.

Final Parameters

-----  
 Rsq 0.9926  
 Rsq\_adjusted 0.9889  
 Corr\_XY -0.9963  
 No\_points\_lambda\_z 4  
 Lambda\_z 1/hr 0.2973  
 Lambda\_z\_lower hr 4.0000  
 Lambda\_z\_upper hr 10.0000  
 HL\_Lambda\_z hr 2.3312  
 Tlag hr 0.0000  
 Tmax hr 1.5000  
 Cmax ng/mL 455.0000  
 Cmax\_D ng/mL/mg 0.3033  
 Tlast hr 10.0000  
 Clast ng/mL 14.4000  
 AUClast hr\*ng/mL 893.5420  
 AUCall hr\*ng/mL 893.5420  
 AUCINF\_obs hr\*ng/mL 941.9719  
 AUCINF\_D\_obs hr\*ng/mL/mg 0.6280  
 AUC\_%Extrap\_obs % 5.1413  
 Vz\_F\_obs mL 5355554.0437  
 Cl\_F\_obs mL/hr 1592404.1867  
 AUCINF\_pred hr\*ng/mL 942.7950  
 AUCINF\_D\_pred hr\*ng/mL/mg 0.6285  
 AUC\_%Extrap\_pred % 5.2242  
 Vz\_F\_pred mL 5350878.1657  
 Cl\_F\_pred mL/hr 1591013.8753  
 AUMClast hr\*hr\*ng/mL 2765.5895  
 AUMCINF\_obs hr\*hr\*ng/mL 3412.7674  
 AUMC\_%Extrap\_obs % 18.9634  
 AUMCINF\_pred hr\*hr\*ng/mL 3423.7672  
 AUMC\_%Extrap\_pred % 19.2238  
 MRTlast hr 3.0951  
 MRTINF\_obs hr 3.6230  
 MRTINF\_pred hr 3.6315

Input File: Workbook - [D:\Gustavo\T...\analito - lista.csv]  
 formname=ácido o-cumárico  
 subject=3

Date: 9/02/2012  
 Time: 21:56:44

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM  
 Version 5.3 Build 200912111339  
 Core Version 18Sept2006

Settings

-----  
 Model: Plasma Data, Extravascular Administration  
 Number of nonmissing observations: 15  
 Dose time: 0.00  
 Dose amount: 1500.00  
 Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation  
 Weighting for lambda\_z calculations: Uniform weighting  
 Lambda\_z method: Find best fit for lambda\_z, Log regression

Summary Table

Time hr	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC hr*ng/mL	AUMC hr*hr*ng/mL	Weight
0.0000	0.0000			0.0000	0.0000	
0.1700	19.80			1.683	0.2861	
0.3300	19.40			4.819	1.068	
0.5000	324.0			34.01	15.38	
0.7500	178.0			96.76	52.32	
1.000	190.0			142.8	92.76	
1.250	169.0			187.6	142.9	
1.500	116.0			223.3	191.1	
2.000	66.70			268.9	267.9	
2.500 *	40.40	40.56	-0.1621	295.7	326.5	1.000
3.000 *	40.80	37.16	3.644	316.0	382.4	1.000
4.000 *	26.90	31.18	-4.279	349.9	497.4	1.000
6.000 *	21.90	21.95	-0.05417	398.7	736.4	1.000
8.000 *	17.70	15.46	2.241	438.3	1009.	1.000
10.00 *	10.10	10.88	-0.7850	466.1	1252.	1.000

\*) Starred values were included in the estimation of Lambda\_z.

Final Parameters

-----  
 Rsq 0.9615  
 Rsq\_adjusted 0.9518  
 Corr\_XY -0.9805  
 No\_points\_lambda\_z 6  
 Lambda\_z 1/hr 0.1754  
 Lambda\_z\_lower hr 2.5000  
 Lambda\_z\_upper hr 10.0000  
 HL\_Lambda\_z hr 3.9520  
 Tlag hr 0.0000  
 Tmax hr 0.5000  
 Cmax ng/mL 324.0000  
 Cmax\_D ng/mL/mg 0.2160  
 Tlast hr 10.0000  
 Clast ng/mL 10.1000  
 AUClast hr\*ng/mL 466.0580  
 AUCall hr\*ng/mL 466.0580  
 AUCINF\_obs hr\*ng/mL 523.6429  
 AUCINF\_D\_obs hr\*ng/mL/mg 0.3491  
 AUC\_%Extrap\_obs % 10.9970  
 Vz\_F\_obs mL 16332152.2353  
 Cl\_F\_obs mL/hr 2864547.4650  
 AUCINF\_pred hr\*ng/mL 528.1185  
 AUCINF\_D\_pred hr\*ng/mL/mg 0.3521  
 AUC\_%Extrap\_pred % 11.7512  
 Vz\_F\_pred mL 16193744.1263  
 Cl\_F\_pred mL/hr 2840271.6321  
 AUMClast hr\*hr\*ng/mL 1251.9692  
 AUMCINF\_obs hr\*hr\*ng/mL 2156.1375  
 AUMC\_%Extrap\_obs % 41.9346  
 AUMCINF\_pred hr\*hr\*ng/mL 2226.4108  
 AUMC\_%Extrap\_pred % 43.7674  
 MRTlast hr 2.6863  
 MRTINF\_obs hr 4.1176  
 MRTINF\_pred hr 4.2157

Input File: Workbook - [D:\Gustavo\T...\analito - lista.csv]  
 formname=ácido o-cumárico  
 subject=4

Date: 9/02/2012  
 Time: 21:56:44

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM  
 Version 5.3 Build 200912111339  
 Core Version 18Sept2006

Settings

-----  
 Model: Plasma Data, Extravascular Administration  
 Number of nonmissing observations: 15  
 Dose time: 0.00  
 Dose amount: 1500.00  
 Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation  
 Weighting for lambda\_z calculations: Uniform weighting  
 Lambda\_z method: Find best fit for lambda\_z, Log regression

Summary Table

Time hr	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC hr*ng/mL	AUMC hr*hr*ng/mL	Weight
0.0000	0.0000			0.0000	0.0000	
0.1700	45.10			3.834	0.6517	
0.3300	69.20			12.98	3.092	
0.5000	185.0			34.58	12.90	
0.7500	302.0			95.46	52.77	
1.000	231.0			162.1	110.0	
1.250	211.0			217.3	171.8	
1.500	122.0			259.0	227.6	
2.000 *	81.40	78.51	2.891	309.8	314.1	1.000
2.500 *	63.90	69.95	-6.049	346.1	394.7	1.000
3.000 *	80.10	62.32	17.78	382.1	494.7	1.000
4.000 *	43.60	49.47	-5.874	444.0	702.1	1.000
6.000 *	25.30	31.18	-5.877	512.9	1028.	1.000
8.000 *	22.00	19.65	2.353	560.2	1356.	1.000
10.00 *	12.70	12.38	0.3193	594.9	1659.	1.000

\*) Starred values were included in the estimation of Lambda\_z.

Final Parameters

-----  
 Rsq 0.9529  
 Rsq\_adjusted 0.9435  
 Corr\_XY -0.9762  
 No\_points\_lambda\_z 7  
 Lambda\_z 1/hr 0.2309  
 Lambda\_z\_lower hr 2.0000  
 Lambda\_z\_upper hr 10.0000  
 HL\_Lambda\_z hr 3.0021  
 Tlag hr 0.0000  
 Tmax hr 0.7500  
 Cmax ng/mL 302.0000  
 Cmax\_D ng/mL/mg 0.2013  
 Tlast hr 10.0000  
 Clast ng/mL 12.7000  
 AUClast hr\*ng/mL 594.8845  
 AUCall hr\*ng/mL 594.8845  
 AUCINF\_obs hr\*ng/mL 649.8903  
 AUCINF\_D\_obs hr\*ng/mL/mg 0.4333  
 AUC\_%Extrap\_obs % 8.4639  
 Vz\_F\_obs mL 9996691.8409  
 Cl\_F\_obs mL/hr 2308081.6757  
 AUCINF\_pred hr\*ng/mL 648.5073  
 AUCINF\_D\_pred hr\*ng/mL/mg 0.4323  
 AUC\_%Extrap\_pred % 8.2687  
 Vz\_F\_pred mL 10018011.2191  
 Cl\_F\_pred mL/hr 2313003.9907  
 AUMClast hr\*hr\*ng/mL 1659.0955  
 AUMCINF\_obs hr\*hr\*ng/mL 2447.3936  
 AUMC\_%Extrap\_obs % 32.2097  
 AUMCINF\_pred hr\*hr\*ng/mL 2427.5731  
 AUMC\_%Extrap\_pred % 31.6562  
 MRTlast hr 2.7889  
 MRTINF\_obs hr 3.7659  
 MRTINF\_pred hr 3.7433



Input File: Workbook - [D:\Gustavo\T...\analito - lista.csv]  
 formname=ácido o-cumárico  
 subject=5

Date: 9/02/2012  
 Time: 21:56:44

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM  
 Version 5.3 Build 200912111339  
 Core Version 18Sept2006

Settings

Model: Plasma Data, Extravascular Administration

Number of nonmissing observations: 15  
 Dose time: 0.00  
 Dose amount: 1500.00  
 Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation  
 Weighting for lambda\_z calculations: Uniform weighting  
 Lambda\_z method: Find best fit for lambda\_z, Log regression

Summary Table

Time hr	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC hr*ng/mL	AUMC hr*hr*ng/mL	Weight
0.0000	0.0000			0.0000	0.0000	
0.1700	11.30			0.9605	0.1633	
0.3300	12.50			2.865	0.6470	
0.5000	21.00			5.712	1.890	
0.7500	18.00			10.59	4.890	
1.000	6.740			13.68	7.420	
1.250	15.60			16.47	10.70	
1.500	26.80			21.77	18.16	
2.000	22.80			34.17	39.61	
2.500	33.30			48.20	71.83	
3.000 *	26.40	26.66	-0.2584	63.12	112.4	1.000
4.000 *	22.10	22.26	-0.1570	87.37	196.2	1.000
6.000 *	15.40	15.51	-0.1144	124.9	377.0	1.000
8.000 *	11.60	10.81	0.7856	151.9	562.2	1.000
10.00 *	7.200	7.538	-0.3382	170.7	727.0	1.000

\*) Starred values were included in the estimation of Lambda\_z.

Final Parameters

-----  
 Rsq 0.9933  
 Rsq\_adjusted 0.9910  
 Corr\_XY -0.9966  
 No\_points\_lambda\_z 5  
 Lambda\_z 1/hr 0.1804  
 Lambda\_z\_lower hr 3.0000  
 Lambda\_z\_upper hr 10.0000  
 HL\_Lambda\_z hr 3.8413  
 Tlag hr 0.0000  
 Tmax hr 2.5000  
 Cmax ng/mL 33.3000  
 Cmax\_D ng/mL/mg 0.0222  
 Tlast hr 10.0000  
 Clast ng/mL 7.2000  
 AUClast hr\*ng/mL 170.6720  
 AUCall hr\*ng/mL 170.6720  
 AUCINF\_obs hr\*ng/mL 210.5734  
 AUCINF\_D\_obs hr\*ng/mL/mg 0.1404  
 AUC\_%Extrap\_obs % 18.9489  
 Vz\_F\_obs mL 39476916.9399  
 Cl\_F\_obs mL/hr 7123407.4601  
 AUCINF\_pred hr\*ng/mL 212.4479  
 AUCINF\_D\_pred hr\*ng/mL/mg 0.1416  
 AUC\_%Extrap\_pred % 19.6640  
 Vz\_F\_pred mL 39128604.3492  
 Cl\_F\_pred mL/hr 7060556.2372  
 AUMClast hr\*hr\*ng/mL 727.0376  
 AUMCINF\_obs hr\*hr\*ng/mL 1347.1792  
 AUMC\_%Extrap\_obs % 46.0326  
 AUMCINF\_pred hr\*hr\*ng/mL 1376.3120  
 AUMC\_%Extrap\_pred % 47.1749  
 MRTlast hr 4.2599  
 MRTINF\_obs hr 6.3977  
 MRTINF\_pred hr 6.4784

Input File: Workbook - [D:\Gustavo\T...\analito - lista.csv]  
 formname=Cumarina  
 subject=1

Date: 9/02/2012  
 Time: 21:56:45

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM  
 Version 5.3 Build 200912111339  
 Core Version 18Sept2006

Settings

-----  
 Model: Plasma Data, Extravascular Administration  
 Number of nonmissing observations: 15  
 Dose time: 0.00  
 Dose amount: 1500.00  
 Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation  
 Weighting for lambda\_z calculations: Uniform weighting  
 Lambda\_z method: Find best fit for lambda\_z, Log regression

Summary Table

Time hr	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC hr*ng/mL	AUMC hr*hr*ng/mL	Weight
0.0000	0.0000			0.0000	0.0000	
0.1700	538.3			45.76	7.778	
0.3300	396.3			120.5	25.56	
0.5000	311.3			180.7	49.91	
0.7500	181.2			242.2	86.35	
1.000	194.1			289.1	127.6	
1.250	281.3			348.6	195.8	
1.500	167.3			404.6	271.1	
2.000	182.2			492.0	425.0	
2.500	90.56			560.2	572.7	
3.000	74.36			601.4	685.0	
4.000 *	32.42	33.04	-0.6216	654.8	861.4	1.000
6.000 *	25.00	24.99	0.007678	712.2	1141.	1.000
8.000 *	20.00	18.90	1.096	757.2	1451.	1.000
10.00 *	13.77	14.30	-0.5287	791.0	1749.	1.000

\*) Starred values were included in the estimation of Lambda\_z.

Final Parameters

-----  
 Rsq 0.9874  
 Rsq\_adjusted 0.9812  
 Corr\_XY -0.9937  
 No\_points\_lambda\_z 4  
 Lambda\_z 1/hr 0.1396  
 Lambda\_z\_lower hr 4.0000  
 Lambda\_z\_upper hr 10.0000  
 HL\_Lambda\_z hr 4.9652  
 Tlag hr 0.0000  
 Tmax hr 0.1700  
 Cmax ng/mL 538.3000  
 Cmax\_D ng/mL/mg 0.3589  
 Tlast hr 10.0000  
 Clast ng/mL 13.7700  
 AUClast hr\*ng/mL 791.0095  
 AUCall hr\*ng/mL 791.0095  
 AUCINF\_obs hr\*ng/mL 889.6487  
 AUCINF\_D\_obs hr\*ng/mL/mg 0.5931  
 AUC\_%Extrap\_obs % 11.0874  
 Vz\_F\_obs mL 12077814.3865  
 Cl\_F\_obs mL/hr 1686058.7590  
 AUCINF\_pred hr\*ng/mL 893.4361  
 AUCINF\_D\_pred hr\*ng/mL/mg 0.5956  
 AUC\_%Extrap\_pred % 11.4643  
 Vz\_F\_pred mL 12026614.8470  
 Cl\_F\_pred mL/hr 1678911.3207  
 AUMClast hr\*hr\*ng/mL 1748.7944  
 AUMCINF\_obs hr\*hr\*ng/mL 3441.7728  
 AUMC\_%Extrap\_obs % 49.1891  
 AUMCINF\_pred hr\*hr\*ng/mL 3506.7772  
 AUMC\_%Extrap\_pred % 50.1310  
 MRTlast hr 2.2108  
 MRTINF\_obs hr 3.8687  
 MRTINF\_pred hr 3.9250

Input File: Workbook - [D:\Gustavo\T...\analito - lista.csv]  
 formname=Cumarina  
 subject=2

Date: 9/02/2012  
 Time: 21:56:45

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM  
 Version 5.3 Build 200912111339  
 Core Version 18Sept2006

Settings

-----  
 Model: Plasma Data, Extravascular Administration  
 Number of nonmissing observations: 15  
 Dose time: 0.00  
 Dose amount: 1500.00  
 Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation  
 Weighting for lambda\_z calculations: Uniform weighting  
 Lambda\_z method: Find best fit for lambda\_z, Log regression

Summary Table

Time hr	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC hr*ng/mL	AUMC hr*hr*ng/mL	Weight
0.0000	0.0000			0.0000	0.0000	
0.1700	348.0			29.58	5.029	
0.3300	217.0			74.78	15.49	
0.5000	156.0			106.5	28.21	
0.7500	322.0			166.2	68.14	
1.000	212.0			233.0	124.8	
1.250	424.0			312.5	217.6	
1.500	780.0			463.0	430.1	
2.000	677.0			827.2	1061.	
2.500	539.0			1131.	1736.	
3.000	300.0			1341.	2298.	
4.000	205.0			1593.	3158.	
6.000 *	70.20	68.85	1.351	1869.	4400.	1.000
8.000 *	45.70	47.51	-1.811	1985.	5186.	1.000
10.00 *	33.43	32.79	0.6434	2064.	5886.	1.000

\*) Starred values were included in the estimation of Lambda\_z.

Final Parameters

-----  
 Rsq 0.9918  
 Rsq\_adjusted 0.9837  
 Corr\_XY -0.9959  
 No\_points\_lambda\_z 3  
 Lambda\_z 1/hr 0.1855  
 Lambda\_z\_lower hr 6.0000  
 Lambda\_z\_upper hr 10.0000  
 HL\_Lambda\_z hr 3.7372  
 Tlag hr 0.0000  
 Tmax hr 1.5000  
 Cmax ng/mL 780.0000  
 Cmax\_D ng/mL/mg 0.5200  
 Tlast hr 10.0000  
 Clast ng/mL 33.4300  
 AUClast hr\*ng/mL 2063.7150  
 AUCall hr\*ng/mL 2063.7150  
 AUCINF\_obs hr\*ng/mL 2243.9562  
 AUCINF\_D\_obs hr\*ng/mL/mg 1.4960  
 AUC\_%Extrap\_obs % 8.0323  
 Vz\_F\_obs mL 3604081.9046  
 Cl\_F\_obs mL/hr 668462.2353  
 AUCINF\_pred hr\*ng/mL 2240.4872  
 AUCINF\_D\_pred hr\*ng/mL/mg 1.4937  
 AUC\_%Extrap\_pred % 7.8899  
 Vz\_F\_pred mL 3609662.2432  
 Cl\_F\_pred mL/hr 669497.2411  
 AUMClast hr\*hr\*ng/mL 5886.2321  
 AUMCINF\_obs hr\*hr\*ng/mL 8660.4333  
 AUMC\_%Extrap\_obs % 32.0331  
 AUMCINF\_pred hr\*hr\*ng/mL 8607.0393  
 AUMC\_%Extrap\_pred % 31.6114  
 MRTlast hr 2.8523  
 MRTINF\_obs hr 3.8594  
 MRTINF\_pred hr 3.8416

Input File: Workbook - [D:\Gustavo\T...\analito - lista.csv]  
 formname=Cumarina  
 subject=3

Date: 9/02/2012  
 Time: 21:56:45

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM  
 Version 5.3 Build 200912111339  
 Core Version 18Sept2006

Settings

-----  
 Model: Plasma Data, Extravascular Administration  
 Number of nonmissing observations: 15  
 Dose time: 0.00  
 Dose amount: 1500.00  
 Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation  
 Weighting for lambda\_z calculations: Uniform weighting  
 Lambda\_z method: Find best fit for lambda\_z, Log regression

Summary Table

Time hr	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC hr*ng/mL	AUMC hr*hr*ng/mL	Weight
0.0000	0.0000			0.0000	0.0000	
0.1700	237.0			20.15	3.425	
0.3300	191.0			54.39	11.69	
0.5000	162.0			84.39	23.93	
0.7500	175.0			126.5	50.46	
1.000	197.0			173.0	91.50	
1.250	269.0			231.3	158.2	
1.500	429.0			318.5	280.6	
2.000	287.0			497.5	585.0	
2.500	120.0			599.3	803.5	
3.000	140.0			664.3	983.5	
4.000	56.20			762.4	1306.	
6.000 *	99.50	99.69	-0.1923	918.1	2128.	1.000
8.000 *	62.80	62.56	0.2421	1080.	3227.	1.000
10.00 *	39.18	39.26	-0.07573	1182.	4121.	1.000

\*) Starred values were included in the estimation of Lambda\_z.

Final Parameters

-----  
 Rsq 0.9999  
 Rsq\_adjusted 0.9999  
 Corr\_XY -1.0000  
 No\_points\_lambda\_z 3  
 Lambda\_z 1/hr 0.2330  
 Lambda\_z\_lower hr 6.0000  
 Lambda\_z\_upper hr 10.0000  
 HL\_Lambda\_z hr 2.9749  
 Tlag hr 0.0000  
 Tmax hr 1.5000  
 Cmax ng/mL 429.0000  
 Cmax\_D ng/mL/mg 0.2860  
 Tlast hr 10.0000  
 Clast ng/mL 39.1800  
 AUClast hr\*ng/mL 1182.3450  
 AUCall hr\*ng/mL 1182.3450  
 AUCINF\_obs hr\*ng/mL 1350.5011  
 AUCINF\_D\_obs hr\*ng/mL/mg 0.9003  
 AUC\_%Extrap\_obs % 12.4514  
 Vz\_F\_obs mL 4766992.6837  
 Cl\_F\_obs mL/hr 1110698.8456  
 AUCINF\_pred hr\*ng/mL 1350.8261  
 AUCINF\_D\_pred hr\*ng/mL/mg 0.9006  
 AUC\_%Extrap\_pred % 12.4725  
 Vz\_F\_pred mL 4765845.6857  
 Cl\_F\_pred mL/hr 1110431.5976  
 AUMClast hr\*hr\*ng/mL 4121.2953  
 AUMCINF\_obs hr\*hr\*ng/mL 6524.5629  
 AUMC\_%Extrap\_obs % 36.8342  
 AUMCINF\_pred hr\*hr\*ng/mL 6529.2082  
 AUMC\_%Extrap\_pred % 36.8791  
 MRTlast hr 3.4857  
 MRTINF\_obs hr 4.8312  
 MRTINF\_pred hr 4.8335

Input File: Workbook - [D:\Gustavo\T...\analito - lista.csv]  
 formname=Cumarina  
 subject=4

Date: 9/02/2012  
 Time: 21:56:45

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM  
 Version 5.3 Build 200912111339  
 Core Version 18Sept2006

Settings

-----  
 Model: Plasma Data, Extravascular Administration  
 Number of nonmissing observations: 15  
 Dose time: 0.00  
 Dose amount: 1500.00  
 Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation  
 Weighting for lambda\_z calculations: Uniform weighting  
 Lambda\_z method: Find best fit for lambda\_z, Log regression

Summary Table

Time hr	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC hr*ng/mL	AUMC hr*hr*ng/mL	Weight
0.0000	0.0000			0.0000	0.0000	
0.1700	93.30			7.931	1.348	
0.3300	58.90			20.11	4.172	
0.5000	824.0			95.15	40.84	
0.7500	880.0			308.2	174.8	
1.000	481.0			478.3	317.5	
1.250	391.0			587.3	438.7	
1.500	218.0			663.4	540.7	
2.000	162.0			758.4	703.4	
2.500	83.20			819.7	836.4	
3.000	72.30			858.6	942.6	
4.000 *	28.60	28.24	0.3555	909.0	1108.	1.000
6.000 *	20.00	19.12	0.8773	957.6	1343.	1.000
8.000 *	11.40	12.95	-1.547	989.0	1554.	1.000
10.00 *	9.400	8.766	0.6344	1010.	1739.	1.000

\*) Starred values were included in the estimation of Lambda\_z.

Final Parameters

-----  
 Rsq 0.9703  
 Rsq\_adjusted 0.9555  
 Corr\_XY -0.9851  
 No\_points\_lambda\_z 4  
 Lambda\_z 1/hr 0.1950  
 Lambda\_z\_lower hr 4.0000  
 Lambda\_z\_upper hr 10.0000  
 HL\_Lambda\_z hr 3.5544  
 Tlag hr 0.0000  
 Tmax hr 0.7500  
 Cmax ng/mL 880.0000  
 Cmax\_D ng/mL/mg 0.5867  
 Tlast hr 10.0000  
 Clast ng/mL 9.4000  
 AUClast hr\*ng/mL 1009.8280  
 AUCall hr\*ng/mL 1009.8280  
 AUCINF\_obs hr\*ng/mL 1058.0305  
 AUCINF\_D\_obs hr\*ng/mL/mg 0.7054  
 AUC\_%Extrap\_obs % 4.5559  
 Vz\_F\_obs mL 7270010.9011  
 Cl\_F\_obs mL/hr 1417728.4622  
 AUCINF\_pred hr\*ng/mL 1054.7773  
 AUCINF\_D\_pred hr\*ng/mL/mg 0.7032  
 AUC\_%Extrap\_pred % 4.2615  
 Vz\_F\_pred mL 7292433.4625  
 Cl\_F\_pred mL/hr 1422101.0971  
 AUMClast hr\*hr\*ng/mL 1739.0817  
 AUMCINF\_obs hr\*hr\*ng/mL 2468.2862  
 AUMC\_%Extrap\_obs % 29.5429  
 AUMCINF\_pred hr\*hr\*ng/mL 2419.0720  
 AUMC\_%Extrap\_pred % 28.1096  
 MRTlast hr 1.7222  
 MRTINF\_obs hr 2.3329  
 MRTINF\_pred hr 2.2934

Input File: Workbook - [D:\Gustavo\T...\analito - lista.csv]  
 formname=Cumarina  
 subject=5

Date: 9/02/2012  
 Time: 21:56:45

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM  
 Version 5.3 Build 200912111339  
 Core Version 18Sept2006

Settings

-----  
 Model: Plasma Data, Extravascular Administration  
 Number of nonmissing observations: 15  
 Dose time: 0.00  
 Dose amount: 1500.00  
 Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation  
 Weighting for lambda\_z calculations: Uniform weighting  
 Lambda\_z method: Find best fit for lambda\_z, Log regression

Summary Table

Time hr	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC hr*ng/mL	AUMC hr*hr*ng/mL	Weight
0.0000	0.0000			0.0000	0.0000	
0.1700	231.0			19.64	3.338	
0.3300	344.0			65.64	15.56	
0.5000	934.0			174.3	64.91	
0.7500	1050.			422.3	221.7	
1.000	913.0			667.6	434.3	
1.250	743.0			874.6	664.5	
1.500	547.0			1036.	883.2	
2.000	207.0			1224.	1192.	
2.500	174.0			1320.	1404.	
3.000	152.0			1401.	1627.	
4.000	56.30			1505.	1967.	
6.000 *	23.00	23.30	-0.2966	1585.	2331.	1.000
8.000 *	17.90	17.45	0.4529	1625.	2612.	1.000
10.00 *	12.90	13.07	-0.1664	1656.	2884.	1.000

\*) Starred values were included in the estimation of Lambda\_z.

Final Parameters

-----  
 Rsq 0.9941  
 Rsq\_adjusted 0.9883  
 Corr\_XY -0.9971  
 No\_points\_lambda\_z 3  
 Lambda\_z 1/hr 0.1446  
 Lambda\_z\_lower hr 6.0000  
 Lambda\_z\_upper hr 10.0000  
 HL\_Lambda\_z hr 4.7947  
 Tlag hr 0.0000  
 Tmax hr 0.7500  
 Cmax ng/mL 1050.0000  
 Cmax\_D ng/mL/mg 0.7000  
 Tlast hr 10.0000  
 Clast ng/mL 12.9000  
 AUClast hr\*ng/mL 1656.2900  
 AUCall hr\*ng/mL 1656.2900  
 AUCINF\_obs hr\*ng/mL 1745.5222  
 AUCINF\_D\_obs hr\*ng/mL/mg 1.1637  
 AUC\_%Extrap\_obs % 5.1121  
 Vz\_F\_obs mL 5944256.5963  
 Cl\_F\_obs mL/hr 859341.7155  
 AUCINF\_pred hr\*ng/mL 1746.6729  
 AUCINF\_D\_pred hr\*ng/mL/mg 1.1644  
 AUC\_%Extrap\_pred % 5.1746  
 Vz\_F\_pred mL 5940340.4921  
 Cl\_F\_pred mL/hr 858775.5771  
 AUMClast hr\*hr\*ng/mL 2883.9804  
 AUMCINF\_obs hr\*hr\*ng/mL 4393.5404  
 AUMC\_%Extrap\_obs % 34.3586  
 AUMCINF\_pred hr\*hr\*ng/mL 4413.0073  
 AUMC\_%Extrap\_pred % 34.6482  
 MRTlast hr 1.7412  
 MRTINF\_obs hr 2.5170  
 MRTINF\_pred hr 2.5265

---

---

## **9. ANEXO 3**

---

---

---

Received 12 March 2009; Accepted 28 October 2009

Revista Brasileira de Farmacognosia  
Brazilian Journal of Pharmacognosy  
20(4): 627-640, Ago./Set. 2010

Artigo

## *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: estudos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil

João C. Gasparetto,<sup>1</sup> Francinete R. Campos,<sup>1</sup> Jane M. Budel,<sup>2</sup> Roberto Pontarolo<sup>\*,1</sup><sup>1</sup>Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Av. Prof. Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico, 80210-170 Curitiba-PR, Brasil.<sup>2</sup>Laboratório de Farmacognosia, Unibrasil, Rua Konrad Adenauer, 442, Tarumã, 82820-540 Curitiba-PR, Brasil.

**RESUMO:** No Brasil as espécies de *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae, popularmente conhecidas como guaco, são amplamente utilizadas com evidências pré-clínicas para o tratamento de doenças onde estejam envolvidas suas ações broncodilatadoras, antialérgicas, antiasmáticas, anti-inflamatórias, antitumorogênicas e relaxantes da musculatura lisa. Em virtude das propriedades terapêuticas atribuídas a essas espécies, ambas foram oficializadas na farmacopeia brasileira, e por serem bastante semelhantes, dificilmente são diferenciadas. Com o objetivo de contribuir com novas pesquisas, a presente revisão descreve, de forma sistematizada, sobre os aspectos farmacológicos, toxicológicos, químicos, agronômicos, morfoanatômicos, genéticos e o uso nos programas de fitoterapia do Brasil destas espécies. As principais diferenças e semelhanças entre as duas espécies são evidenciadas através da comparação das informações baseadas na literatura específica.

**Unitermos:** Asteraceae, *Mikania glomerata*, *Mikania laevigata*, guaco, plantas medicinais.

**ABSTRACT:** "Mikania glomerata Spreng. e M. laevigata Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: agronomic, genetic, anatomical, chemical, pharmacological, toxicological studies and its use in herbal therapy programs in Brazil." In Brazil the species of *Mikania glomerata* Spreng. and *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae popularly known as guaco, are widely used with preclinical evidence for the treatment of diseases whose actions involve bronchodilators, antiallergic, anti-asthmatic, anti-inflammatory, antitumorogenic and smooth muscles relaxant. Due to the therapeutic properties attributed to these species, both were included in the official Brazilian Pharmacopoeia, and because of their similarity, they are hardly differentiated. In order to contribute to the new research, this review describes their several aspects: pharmacology, toxicology, chemical, agricultural, anatomical, genetics and the use in herbal medicine programs in Brazil, in a systematic way. The main differences and similarities between the two species are evidenced by comparing the information based on literature.

**Keywords:** Asteraceae, *Mikania glomerata*, *Mikania laevigata*, guaco, medicinal plants.

### INTRODUÇÃO

A família Asteraceae compreende, aproximadamente, 1500 gêneros e 23000 espécies (Judd et al., 1999), no qual está inserido o gênero *Mikania* que abrange cerca de 430 espécies distribuídas principalmente em regiões neotropicais. Nos países andinos foram constatadas cerca de 150 espécies. No Brasil, o gênero, com 171 espécies, tem sua principal área de dispersão nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Angely, 1965; Oliveira, 1972; Holmes, 1995; Ritter &

Miotto, 2005).

Dentre as principais espécies medicinais pertencentes ao gênero *Mikania*, encontram-se a *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae. Ambas ocorrem principalmente na Floresta Atlântica do Brasil, crescendo desde o estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul, podendo, também, serem encontradas na Bahia, Paraguai e noroeste da Argentina (Moraes, 1997; Lima et al., 2003b; Freire et al., 2006). Em virtude de essas espécies compartilharem o mesmo habitat, estas dificilmente são distinguidas, pois apresentam

\*E-mail: pontarolo@ufpr.br; Tel: +55 41 3360 4076 Fax: +55 41 3360 4101



João C. Gasparetto  
Thais M. Guimarães de  
Francisco  
Francinete R. Campos  
Roberto Pontarolo

Department of Pharmacy, Center  
of Biopharmacy, Federal  
University of Paraná, Curitiba,  
Paraná, Brazil

Received November 11, 2010

Revised January 8, 2011

Accepted January 9, 2011

## Research Article

# Development and validation of two methods based on high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining 1,2-benzopyrone, dihydrocoumarin, o-coumaric acid, syringaldehyde and kaurenoic acid in guaco extracts and pharmaceutical preparations

In this study, two HPLC-ESI-MS/MS methods were developed and validated for the determination of 1,2-benzopyrone (COU), o-coumaric acid (OCA), kaurenoic acid (KAU), syringaldehyde (SYR), and dihydrocoumarin (DIH) in guaco extracts and pharmaceutical preparations (syrup and oral solution). The chromatographic separation was achieved using a C18 XBridge 150 × 2.1-mm (5-μm particle size) column maintained at 25°C. The mobile phases consisted of a gradient of water and acetonitrile containing 0.05% formic acid or 5 mM ammonium formate for the positive and negative ion modes, respectively. All of the calibration curves showed excellent coefficients of correlation ( $r \geq 0.9970$ ) over the ranges of 1.25–400 ng/mL for coumarin, 10–600 ng/mL for dihydrocoumarin, 5–250 ng/mL for KAU, and 25–500 ng/mL for o-coumaric acid and syringaldehyde. The range of recovery was 96.3–103% with an RSD% of < 4.85% for intraday and interday precision. The results indicate that the developed methods are fast, efficient, and sensitive for the quantification of the guaco metabolites in extracts and pharmaceutical forms while avoiding purification and derivatization steps.

**Keywords:** 1,2-Benzopyrone / Dihydrocoumarin / Guaco / HPLC-MS/MS / Kaurenoic acid / o-Coumaric acid / Syringaldehyde  
DOI 10.1002/jssc.201000792

## 1 Introduction

*Mikania laevigata* and *M. glomerata*, popularly known as guaco, are important medicinal species used to primarily treat respiratory diseases [1]. These species are reported to have anti-inflammatory, anti-allergy, and bronchodilation properties [2–5]. Due to the therapeutic effects attributed to these species, pharmaceutical preparations, which include syrup and oral solutions, are widely used by the South American population, and they are also distributed through various government phytotherapy programs [6, 7]. In

general, the pharmacological effects of guaco are attributed mainly to coumarin (COU) (1,2-benzopyrone), but the studies have demonstrated that this is not the only bioactive component present in the extracts. Studies that evaluated the isolated markers in the mice allergic pneumonitis model have demonstrated that both COU and o-coumaric acid (OCA) are part of the phytochemical and responsible for the therapeutic activity of the guaco species [8].

Other metabolites found in guaco extracts have been shown to have important pharmacological activities and, thus, are the targets of further research. Anti-inflammatory and antioxidant properties have been attributed to dihydrocoumarin (DIH) [9, 10], which has been reported to be one of the major compounds in hydroalcoholic extracts [11]. Syringaldehyde (SYR), which was recently isolated through semi-preparative HPLC [12], has shown prostaglandin synthetase inhibition (COX-2) and antioxidant activity [13–15]. Finally, kaurenoic acid (KAU), isolated from both species [2, 16, 17], has important pharmacological properties, including antimicrobial, antinociceptive, anti-inflammatory, and smooth muscle relaxant effects [18–24].

In addition to the guaco benefits, macerations and infusions from *M. glomerata* have demonstrated genotoxic

**Correspondence:** Dr. Roberto Pontarolo, Department of Pharmacy, Center of Biopharmacy, Federal University of Paraná, 832 Lothário Meissner Avenue, 80210-170 Curitiba, Paraná, Brazil  
E-mail: pontarolo@ufpr.br  
Fax: +55-41-33604101

**Abbreviations:** CE, collision energy; CEP, collision cell entrance potential; COU, coumarin; CXP, cell exit potential; DIH, dihydrocoumarin; DP, declustering potential; EP, entrance potential; IS, internal standard; KAU, kaurenoic acid; OCA, o-coumaric acid; SYR, syringaldehyde



## Research Article

## Open Access

# Simultaneous Determination of Coumarin, O-Coumaric Acid, Dihydrocoumarin and Syringaldehyde in Guaco Extracts and Pharmaceutical Preparations by HPLC-DAD

João Cleverson Gasparetto, Thais Martins Guimarães de Francisco, Francinete Ramos Campos and Roberto Pontarolo\*

Department of Pharmacy, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

**Abstract**

In this study a new HPLC-DAD method for simultaneous determination of coumarin, o-coumaric acid, dihydrocoumarin and syringaldehyde in guaco extracts and pharmaceutical preparations without sample pre-treatment has been developed. The chromatographic separation was carried out on a XBridge C18 (150 x 4.6mm, 5µm) column maintained at room temperature. The mobile phase consisted of water/methanol/acetonitrile/formic acid (65:30:5:1, v/v/v/v) eluted at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup> in an isocratic system. The validation procedures showed excellent selectivity and linearity over a range of 1.0 to 200 µg mL<sup>-1</sup> for all compounds ( $r > 0.999$ ). The range of recovery was 97.9 to 101.8% with a RSD < 5% for intra-day and inter-day precision. The robustness study indicated that flow rate was the only critical factor. Sample analyses demonstrated a lack of standardization in the amounts of the main guaco metabolites among the evaluated samples. The new method is presented as an alternative for the quality control of guaco extracts and pharmaceutical preparations.

**Keywords:** Guaco; HPLC; Coumarin; o-Coumaric acid; Dihydrocoumarin; Syringaldehyde

**Introduction**

*Mitania glomerata* Sprengel and *M. levis* Schultz Bip. ex Baker, commonly known as guaco, are medicinal species used for the treatment of several inflammatory and allergic conditions, particularly in the respiratory system due to their bronchodilator properties [1-4]. Because of the therapeutic effects attributed to these species, the preparations syrup and oral solution are widely used by the South American population, and have been distributed for free government phytotherapy programmes [5,6].

The pharmacological effects of guaco are attributed mainly to the presence of coumarin (1,2-benzopyrone), however other metabolites have demonstrated synergism to produce the desirable pharmacological effects. Studies that evaluated isolated markers in the mice allergic pneumonitis model have demonstrated that coumarin and o-coumaric acid are part of the phytochemical complex that is responsible for the therapeutic activity of the guaco species [2]. Besides these, dihydrocoumarin [7] and syringaldehyde [8], recently described as the major compounds in hydroalcoholic extracts, revealed the antioxidant, immunologic and anti-inflammatory properties [9-14]. Therefore the presence of these metabolites is directly related to the guaco benefits and its monitoring considered an important tool for the extracts characterization, quality control and therapeutic effects warranty.

Despite the pharmacological relevance of these substances, in the literature only one method was described for the simultaneous determination of three of these metabolites in guaco extracts [15]. However this method does not apply to the pharmaceutical preparations due to the complex matrices composed mainly for honey, preservatives, sweeteners and in some cases other plant associations. Consequently, for pharmaceutical preparations, mostly of developed methods require several extraction processes [16-18] and therefore are laborious and require high time and chemical-consuming. In other case, using UV analysis no extraction process was applied [19], however no assurance

can be asserted specially regarding the selectivity, once the method was not validated and preservatives and another syrup constituents can absorb in the same wavelength chosen [16].

Techniques such high performance liquid chromatography (HPLC) [17] and gas chromatography (GC) [18] have also been used for the guaco phytomedicines quality control. However, despite the high potential of selectivity of these techniques, all available methods monitor only coumarin as marker, and no other metabolite related to the guaco therapeutic effects. To meet these requirements, recently our research group published LC-MS/MS methods for the determination of the major guaco metabolites in extracts and preparations [20]. Nevertheless, the development of alternative techniques such as HPLC-DAD becomes important, especially because the most of research and routine analysis laboratories use this system for qualitative and quantitative assay.

This work deals the development and validation of a new method for simultaneous determination of coumarin, o-coumaric acid, dihydrocoumarin and syringaldehyde directly in guaco extracts and pharmaceutical preparations (syrup and oral solution) without the need for sample pre-treatment. Therefore for those methods described in the literature, it may be a simple alternative to quantify the main

\*Corresponding author: Dr. Roberto Pontarolo, Department of Pharmacy, Universidade Federal do Paraná, 832, Prefeito Lofredo Meloan, Curitiba - PR, 80210-170, Brazil; Tel: +55 41 33804078; Fax: +55 41 33804101; E-mail: [rpontarolo@ufpr.br](mailto:rpontarolo@ufpr.br)

Received December 08, 2011; Accepted December 29, 2011; Published December 31, 2011

Citation: Gasparetto JC, Guimarães de Francisco TM, Campos FR, Pontarolo R (2011) Simultaneous Determination of Coumarin, O-Coumaric Acid, Dihydrocoumarin and Syringaldehyde in Guaco Extracts and Pharmaceutical Preparations by HPLC-DAD. Pharm Anal Acta 2:145. doi:10.4172/2153-2435.1000145

Copyright: © 2011 Gasparetto JC, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## ***Mikania glomerata* and *M. laevigata*: Clinical and Toxicological Advances**

João Cleverston Gasparetto, Roberto Pontarolo,  
Thais M. Guimarães de Francisco and Francinete Ramos Campos  
*Department of Pharmacy, Universidade Federal do Paraná,  
Brazil*

### **1. Introduction**

*Mikania laevigata* and *M. glomerata*, commonly known as guaco, are important medicinal plant species used in South America for the treatment of respiratory diseases. In folk medicine, their leaves have ample use due to their balsamic, antiophidic, appetite stimulant, antispasmodic, expectorant, and antimalarial properties, among others (Coimbra, 1942; Lucas, 1942; Neves & Sá, 1991; Alice et al., 1995; Gasparetto et al., 2010; Napimoga & Yatsuda, 2010).

There is also pre-clinical evidence of the anti-inflammatory, anti-allergy, and bronchodilation activities of these species (Fierro et al., 1999; Moura et al., 2002; Suyenaga et al., 2002; Graca et al., 2007a). Due to their important effects, pharmaceutical preparations, including syrup and oral solutions, are freely distributed through various government phytotherapy programs and, thus, are widely used by the population (Gasparetto et al., 2010).

The pharmacological effects of guaco are attributed mainly to the presence of coumarin (1,2-benzopyrone); however, other metabolites have been shown to produce significant pharmacological effects. Studies that have evaluated isolated markers in the mouse model of allergic pneumonitis have demonstrated that coumarin and *o*-coumaric acid are part of the phytocomplex that is responsible for the therapeutic activities of guaco species (Santos et al., 2006). In addition, dihydrocoumarin and syringaldehyde have antioxidant, immunologic and anti-inflammatory properties (Farah & Samuelsson, 1992; Hoult & Paya, 1996; Bortolomeazzi et al., 2007; Stanikunaite et al., 2009; Gu & Xue, 2010). Finally, kaurenoic acid, isolated in high quantities from both species (Fierro et al., 1999; Veneziani et al., 1999; Yatsuda et al., 2005), has been shown to contribute to the effects of guaco through its antimicrobial, antinociceptive, anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities (Block et al., 1998; Costa-Lotufo et al., 2002; Wilkens et al., 2002; Cunha et al., 2003; Cotoras et al., 2004; Tirapelli et al., 2004; Cavalcanti et al., 2006).

The presence of these metabolites is directly related to the benefits of guaco, but studies have shown them to be toxic. Dihydrocoumarin administered to groups of rodents led to carcinogenic activity, ulcers, forestomach inflammation, parathyroid gland hyperplasia and increased nephropathy (National Toxicology Program, 1993a). Kaurenoic acid has been shown to kill sea urchin embryos and to cause hemolysis in mouse and human erythrocytes



(Costa-Lotufo et al., 2002); it also induces DNA breaks, cytogenetic abnormalities in human peripheral blood leukocytes, and positive genotoxic effects in the liver, kidney and spleen of mice (Cavalcanti et al., 2010). In addition, kaurenoic acid has been shown dose-dependent genotoxicity in Chinese hamster lung fibroblast cells (Cavalcanti et al., 2006).

Isolated coumarin has been shown to be carcinogenic, especially in the liver and lungs of rats and mice (Lake, 1999). With long exposure, this substance may change biochemical and hematological parameters and cause ulcers and necrosis, fibrosis, and cytologic alterations in the liver (National Toxicology Program, 1993b). In humans, the majority of tests for mutagenicity and genotoxicity suggest that coumarin is not toxic. This low toxicity is attributed to the mechanism of the detoxification of coumarin, which occurs via the 7-hydroxylation pathway in humans. In rats and mice, the main route is by 3,4-epoxidation, resulting in the formation of toxic metabolites (Lake, 1999).

Considering that the toxic and therapeutic effects of these metabolites are dose dependent, understanding their mechanisms and scientific advances is a key point to validate their therapeutic indications without putting human health at risk. This chapter describes the scientific aspects of guaco, especially the pre-clinical and clinical studies, with a particular emphasis on the pharmacological and toxicological effects of the extracts, preparations and isolated metabolites.

**Keywords:** *Mikania laevigata*, *Mikania glomerata*, guaco, toxicity, pharmacological effects, review, coumarin, o-coumaric acid and kaurenoic acid.

## 2. General overview

*Mikania glomerata* Sprengel and *M. laevigata* Schultz Bip. ex Baker, commonly known as guaco, are medicinal species used to treat several inflammatory and allergic conditions, particularly in the respiratory system due to their bronchodilator properties (Gasparetto et al., 2010).

Both species grow in the same regions and have similar morphological characteristics, which make them hard to distinguish. The leaves are similar, and both species have the characteristic odor of coumarin. The main difference between the species is the flowering period, which occurs in January for *Mikania glomerata* and September for *M. laevigata*. Therefore, humans use these plants without distinction (Lima, 2003; Ritter & Miotto, 2005).

An similar chemical profile has also been described for these plants (Oliveira, 1986; Lima & Biasi, 2002). Therefore, detailed studies of their morphological and anatomical features are necessary to allow botanical identification and quality control of these medicinal species in the absence of another way to make the distinction.

In folk medicine, these plants have a long history of use by rainforest inhabitants, especially by native peoples in South American, who have an ancient tradition of using guaco for the treatment of several diseases. Amazonian tribes have used the crushed leaf topically on skin eruptions and on snakebites. They also consume teas made from the leaves and/or stems against snake venom and to cure fevers, stomach disorders and rheumatism. South American tribes also believe that the aroma of the freshly crushed leaves left around sleeping areas keeps snakes away (Napimoga & Yatsuda, 2010).

In recent decades, guaco has been used as a home and commercial remedy. In popular medicine, the leaves have been widely used due to their tonic, antipyretic, balsamic, antiphidic, appetite stimulant, neuralgia, antispasmodic, expectorant, and antimalarial properties and for the treatment of rheumatism, eczema, influenza, asthma and sore throat.

## Full Length Research Paper

## Chemical constituents of *Mikania glomerata* Spreng and *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker

João C. Gasparetto, Thais M. G. de Francisco and Roberto Pontarolo\*

Department of Pharmacy, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brazil.

Accepted 4 October, 2012

The species *Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*, which are commonly known as guaco, are medicinal plant species widely employed for the treatment of respiratory diseases. In traditional medicine, both species have a long history of use. Currently, the medical use of these plants is widespread because pre-clinical studies have demonstrated their hypo-allergenic, antiasthmatic and antiulcerogenic properties. In recent decades, many studies have been conducted with the aim of isolating and identifying the metabolites of guaco from distinct extracts. Overall, making a correlation between a particular extract and its metabolic profile is difficult, because the reports from the literature are extensive and scattered. The present work provides an overview of the metabolic profiles of the guaco species, including extraction procedures, yields, analytical methods and the therapeutic potential of the main guaco metabolites. This review will contribute to the field by providing the historical context of the guaco species, which will be useful for guiding the design of new studies.

**Key words:** *Mikania glomerata*, *Mikania laevigata*, guaco, review, metabolites, coumarin.

### INTRODUCTION

The species *Mikania glomerata* Sprengel and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker, commonly known as guaco, are native plants of South America that are widely employed for the treatment of several inflammatory and allergic conditions (Moraes and Monteiro, 2006; Teske and Tretine, 1997; Duke et al., 2009). Both species grow in the same region and have similar morphological and chemical characteristics (Neves and Sá, 1991; Ceolin et al., 2006; Bastos et al., 2011; Oliveira et al., 1986; Lima and Biasi, 2002; Lima, 2003; Ritter and Miotto, 2005). One main difference between these species is in their flowering periods, which is September for *M. laevigata* and January for *M. glomerata* (Gasparetto et al., 2010; Napimoga and Yatsuda, 2010). Humans use these plants without distinction.

The guaco species have long been used by rainforest inhabitants, who have an ancient tradition of using guaco for snake bites, fevers, stomach discomfort and rheumatism (Pereira et al., 1994; Napimoga and Yatsuda, 2010).

In folk medicine, guaco leaves have numerous uses because of their tonic, antipyretic, balsamic, antiphlogistic, stimulant, orexigenic, antispasmodic, expectorant, antimalarial and other properties (Coimbra, 1942; Lucas, 1942; Neves and Sá, 1991; Ruppelt et al., 1991; Galvani and Barreneche, 1994; Alice et al., 1995; Cortez et al., 1999; Matos, 2000; Gasparetto et al., 2010; Napimoga and Yatsuda, 2010).

Pre-clinical studies have also demonstrated that the guaco species can promote broncho-dilative, anti-ulcerogenic, hypo-allergenic, antispasmodic, anti-inflammatory, analgesic, antiphlogistic, antiparasitic and monoamine oxidase inhibitor effects (Oliveira et al., 1985; Ruppelt et al., 1991; Block et al., 1998; Fierro et al., 1999; Aboy et al., 2002; Soares de Moura et al., 2002; Suyenaga et al., 2002; Amaral et al., 2003; Bighetti et al., 2005; Luize et al., 2005; Maiorano et al., 2005; Santos et al., 2006; Graca et al., 2007; Freitas et al., 2008). Due to guaco's important effects, pharmaceutical preparations,

\*Corresponding author. E-mail: pontarolo@ufpr.br. Fax: +55 41 33604101.